

THÈSES

présentées

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

par

Madame Simone CLERMONT-BEAUGIRAUD

PREMIÈRE THÈSE

Etude de deux Osidases : β Mannanase et α Mannosidase
des Semences Germées de Fenugrec

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

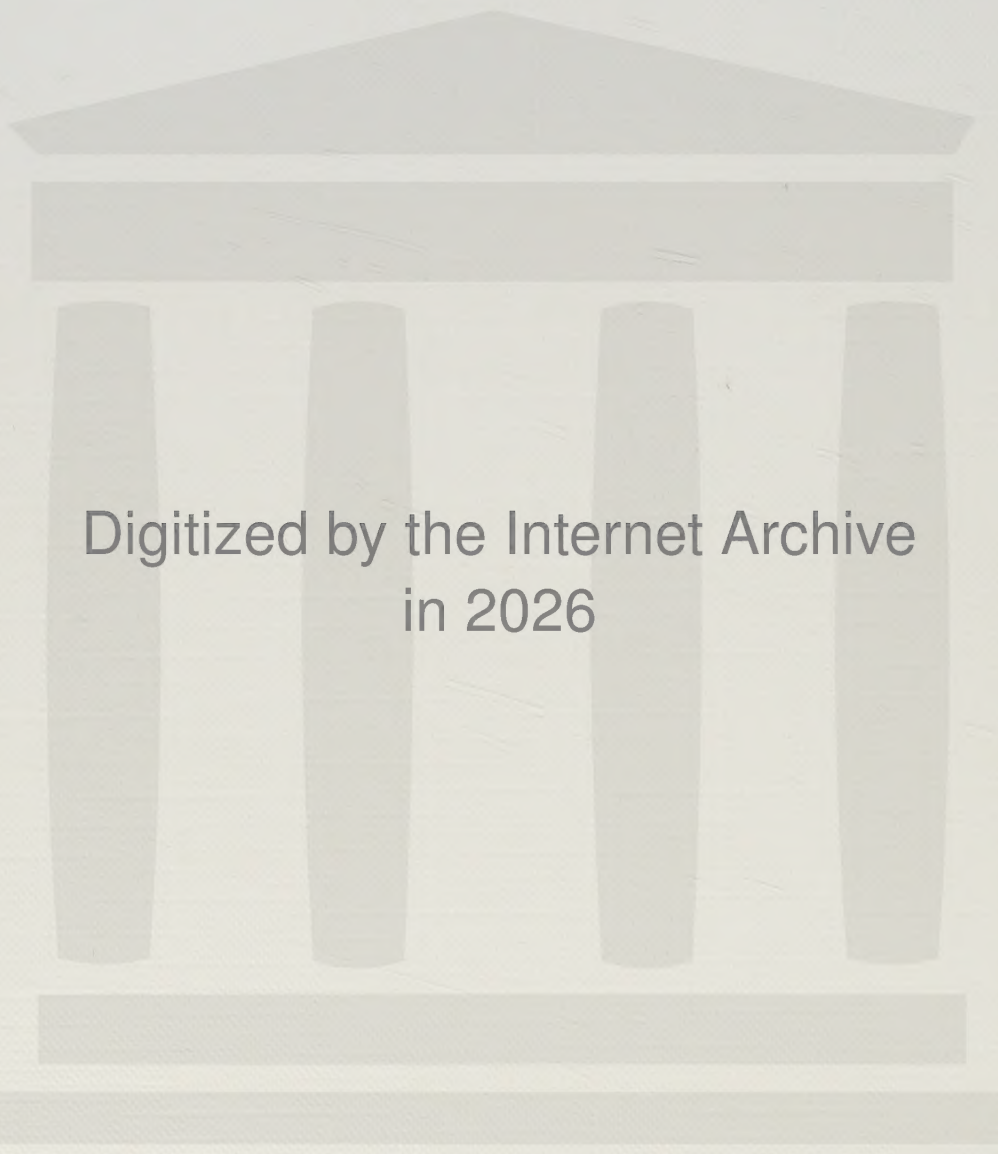
Soutenues le 1^{er} Juillet 1968

JURY : MM. les Professeurs J. E. COURTOIS, Président

F. PERCHERON

M. GUERNET

} Examinateurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549932_0009

THÈSES

présentées

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

par

Madame Simone CLERMONT-BEAUGIRAUD

PREMIÈRE THÈSE

**Etude de deux Osidases : β Mannanase et α Mannosidase
des Semences Germées de Fenugrec**

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 1^{er} Juillet 1968

JURY : MM. les Professeurs J. E. COURTOIS, Président

F. PERCHERON
M. GUERNET } Examineurs

THÈSES

présentées

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

(Mémoire d'Etat)



Madame Simone CLERMONT-BEAUGIRAUD

PREMIÈRE THÈSE

Etude de deux Osidases : le Mannanase et le Mannosidase
des Semences Germinées de Fougères

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenue le 17 Juillet 1968

JURY : MM. les Professeurs J. E. COURTOIS, Président

Examinateurs :
F. PERCHERON
M. GUERNET

P E R S O N N E L D E L A F A C U L T E
D E P H A R M A C I E D E P A R I S
A D M I N I S T R A T I O N

MALANGEAU P.....	DOYEN
GUILLOT M.....	Assesseur, O +
DELAVEAU P.....	Assesseur
RODINEAU L.....	Secrétaire Général, +
FERRARI (Mme S.).....	Attachée Principale
JEANDEL L.....	Attaché
ESPINASSE (Mme M.-L.).....	Attachée
BRENN A.....	Attaché, +
JACOB A.....	Attaché, +
MUR (Mme A.-M.).....	Attachée
FRIZOL (Mlle E.).....	Attachée
TRICAN J.....	Attaché

P R O F E S S E U R S H O N O R A I R E S

LAUNOY L.....	O +
FLEURY P.....	O +
PICON M.....	O +

P R O F E S S E U R S

JANOT M.-M., O +, Membre de l'Institut.	Pharmacie Galénique (T)
VALETTE G., O +,	Pharmacodynamie (T)
PARIS R., +,	Matière Médicale (T)
GUILLOT M., O +,	Physique (T)
GAUTIER J.-A., O +,	Chimie Organique (T)
LAMBIN (M ^{le} S.), +,	Microbiologie (T)
RAOUL Y., +,	Physiologie (T)
COURTOIS J., +,	Chimie Biologique (T)
DOMANGE L., O +,	Chimie Générale et Minérale (T)
TRUHAUT R., O +,	Toxicologie (T)
MORETTE A., +,	Hydrologie (T)
CAVIER R., +,	Parasitologie (T)
QUEVAUVILLER A., +,	Hygiène et Education Sanitaire (T)
MOREAU R., +,	Pharmacie Chimique (T)
GERMAN A.	Virologie et Sérologie
PIETTE M., +,	Biologie Sanguine, Hématologie (T)
MALANGEAU P.	Chimie Analytique (T)
GIRARD M., +,	Biochimie Appliquée (T)
DILLEMANN G.	Législation, Déontologi et Histologie de la Pharmacie (T)
DEYSSON G.	Botanique (T)
MICHEL R.	Endocrinologie (T)
FLAHAUT J.	Minéralogie (T)
RENAULT J.	Chimie Organique (T)
LE HIR A.	Pharmacie Galénique (T)
BOUDENE C.	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
DELAVEAU P.	Matière Médicale et Séméiologie (T)
LARUELLE P.	Physique (T)
ROSSIGNOL P.	Pharmacodynamie (T)
MANGEOT A.	Pharmacie Galénique

P R O F E S S E U R S

COHEN Y.....	Pharmacodynamie
RENAULT H.....	Physique
BOURDON R.....	Chimie Analytique
REYNAUD P.....	Pharmacie Chimique
LE MOAN R.....	Toxicologie
POISSON J.....	Pharmacie Galénique
LECLERC M.....	Hématologie
SAVEL J.....	Biologie Animale
PERCHERON F.....	Chimie Biologique

M A I T R E S _ D E _ C O N F E R E N C E S

PAOLETTI C.....	Toxicologie
DESVIGNES A.....	Cryptogamie et Technique Bactériologique
BORY M.....	Microbiologie
MIOUQUE M.....	Chimie Organique
GUIGNARD J.L.....	Botanique Générale
GOUNELLE J.C.....	Physiologie
BINET P.....	Biologie Animale
COMBET-FARNOUX C.....	Chimie Organique
PLAT (Mme M.).....	Législation et Déontologie Pharmaceutique
DELACOUX E.....	Pharmacie Chimique
ADOLPHE C.....	Physique
GUERNET M.....	Chimie Analytique et Bromatologie
DIDRY J.....	Mathématiques
KHODADAD P.....	Chimie Minérale et Minéralogie
PERLES R. (F.F.).....	Chimie Biologique
YONGER J. (F.F.).....	Chimie Analytique
RIVET J. (F.F.).....	Chimie Générale et Minérale
MAZEDON J. (F.F.).....	Physique

M A I T R E S _ D E _ C O N F E R E N C E S

ETIENNE J. (F.F.)..... Mathématiques
MESTRE J. (F.F.)..... Botanique
BOURRINET P. (F.F.)..... Hygiène Education Sanitaire
SOULEAU Ch. (F.F.)..... Chimie Générale et Minérale

C H E F S _ D E _ T R A V A U X _ P R A T I Q U E S

AGNERAY J..... T.P. Chimie Biologique
3ème année
ASTIN C. (F.F.)..... T.P. Physique 1ère année
AYMARD P. (F.F.)..... Physiologie
BARNIER (Mlle S.) (F.F.)..... Mathématiques
BERNARD (Mlle J.)..... T.P. Microbiologie
BESANCON P. (F.F.)..... Mathématiques
BIGET (Mme M.P.) (F.F.)..... Mathématiques
BLANC (Mme J.)..... E.D. Chimie Organique
BONALY (Mme J.) (F.F.)..... T.P. Botanique
BOURNIQUE (Mlle C.) (F.F.)..... T.P. Physiologie Végétale
2ème année
BRALET M. (F.F.)..... T.P. Zoologie 1ère année
CARLIER A..... C.E.S. Pharmacie Galénique
Industrielle
CARRE D. (F.F.)..... Chaire de Physique
(Mathématiques)
CENAC (Mme J.) (F.F.)..... C.E.S. Parasitologie
Pharmaceutique et Technique
CHARPENTIER (Mme M.)..... E.D. Chimie Minérale et
Générale 1ère année
CHOIX (Mlle M.)..... T.P. Pharmacie Galénique
3ème année
CLAIR (Mlle G.) (F.F.)..... E.D. Essais des drogues
végétales
COMPAGNON P. (F.F.)..... E.D. Chimie Organique
DAGRON Ch..... E.D. Chimie Générale et
Minérale 2ème année

C H E F S _ D E _ T R A V A U X _ P R A T I Q U E S

DAVY J. (F.F.).....	C.E.S. Biochimie
DECAUDIN (Mlle M.Th.).....	T.P. Parasitologie 4ème année
DELCOURT A. (F.F.).....	T.P. Botanique
DREUX C.....	C.E.S. Electrochimie Appliquée à l'Analyse
DUMANT (Mlle G.).....	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Physico-Chimie)
DUCLOS J.P.....	Chaire de Chimie Organique
DUPONT (Mme Ch.).....	T.P. Pharmacodynamie 4ème année
ETIENNE G.....	T.P. Pharmacie Galénique 2ème et 3ème années
FAURE (Mme L.) (F.F.).....	E.D. Chimie Organique 1ère année
FLEURY (Mlle S.).....	E.D. Chimie Analytique Qualitative
FOGLIETTI (Mlle M.J.) (F.F.).....	T.P. Chimie Biologique 3ème et 4ème années
GAYRAL P. (F.F.).....	Zoologie 1ère année
GOURSAT (Mlle M.J.) (F.F.).....	E.D. Botanique 1ère année
HAMON M.....	T.P. Chimie Analytique Quantitative
HARISPE J.....	T.P. Chimie Organique 2ème année
HENRY J.....	T.P. Chimie 4ème année
HUBERT (Mme J.).....	C.E.S. Bactériologie Pharmaceu- tique et Technique
JULIEN R. (F.F.).....	E.D. Chimie Générale et Minérale
JUND (Mlle Y.).....	C.E.S. Microbiologie
LALEGERIE P. (F.F.).....	C.E.S. Biochimie
LAROCHE J.....	T.P. Physique 2ème année
LEBOEUF M. (F.F.).....	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
LEDUC (Mme Y.).....	T.P. Chimie 4ème année
LEGER (Mme N.).....	Parasitologie 4ème année
LELUC R.....	T.P. Microbiologie 4ème année
LEMONNIER A.....	T.P. Chimie Analytique Quantitative
LEVILLAIN P.....	E.D. Chimie Analytique

LIKFORMAN J.....	E.D. Physique 1ère année
LONGEVIALLE (Mlle M.).....	E.D. Botanique 1ère année
MACCARIO J. (F.F.).....	Mathématiques 1ère année
MAHUZIER G. (F.F.).....	T.P. Chimie Analytique Qualitative
MANDEREAU J.....	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
MARTIN FRERES H.....	T.P. Chimie Minérale 1ère année
MAUGUEN Y. (F.F.).....	Chaire de Physique
MICHELET (Mlle A.) (F.F.).....	E.D. Chimie Générale et Minérale 2ème année
MORIN (Mlle H.).....	C.E.S. Pharmacodynamie et Essai Biologiques des Médicaments
MOULIN P. (F.F.).....	T.P. Physique 1ère année
N'GUYEN PHU LICH (F.F.).....	C.E.S. Toxicologie et Etudes Sanitaires
NOTTEGHEM (Mme J.) (F.F.).....	T.P. Zoologie 1ère année
PARIS M.....	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Biologie)
PESTIS J.....	T.P. Anatomie et Physiologie 2ème année
POULLAIN P.....	C.E.S. Hématologie
QUENEZ P. (F.F.).....	Chaire de Chimie Générale et Minérale
ROBERT (Mme M.).....	C.E.S. Immunologie Générale et Appliquée
RODIER N. (F.F.).....	T.P. Physique 2ème année
ROLLEN (Mlle A.).....	T.P. Botanique 1ère année
ROUSSELET F.....	Biochimie Appliquée
ROUSSELET (Mlle R.) (F.F.).....	T.P. Essais des Drogues Végétales
SEILLER (Mme M.) (F.F.).....	C.E.S. Pharmacie Galénique et Industrielle
STRUPLER (Mlle N.).....	T.P. Chimie Générale et Minérale 1ère année
THUONG CONG TRIEU.....	T.P. Chimie Analytique Quantitative
TROUPEL (Mlle S.) (F.F.).....	T.P. Chimie Analytique Qualitative
VIERFOND J.M. (F.F.).....	E.D. Chimie Organique 1ère et 2 années
VILLERS J. (F.F.).....	Physique

B I B L I O T H E Q U E

RUYSSEN (Mle Y.)..... Conservateur en Chef, +
LAVAUD (Mle S.)..... Conservateur, +
DESGRIPPES (Mme A.)..... Conservateur
BOUVRESSE (Mle A.M.)..... Bibliothécaire

+ Légion d'Honneur
O Officier
C Commandeur

A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS,
Professeur de Chimie biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Membre de l'Académie Nationale de Médecine,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

qui, après nous avoir confié le sujet de cette thèse,
nous a manifesté une constante bienveillance et nous
a fait l'honneur de présider notre Jury,
En témoignage de notre profonde gratitude et de notre
respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur F. PERCHERON,
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

qui, après nous avoir guidée et conseillée tout au
long de ce travail, nous a fait l'honneur de bien
vouloir le juger,

En témoignage de notre profonde reconnaissance et
de notre respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur M. GUERNET,

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

qui a bien voulu accepter de juger ce travail,

En témoignage de notre respectueuse gratitude.

AUX MIENS

A MES AMIS

ETUDE DE DEUX OSIDASES : β MANNANASE ET α
MANNOSIDASE DES SEMENCES GERMEES DE FENUGREC

-O-O-O-

I N T R O D U C T I O N

-o-o-o-

Il est possible de distinguer parmi les enzymes qui hydrolysent les substrats à liaison mannopyranosyl, des polysaccharidases, qu'on appelle mannanases (α ou β), dont le substrat préférentiel est constitué par des mannanes (α ou β) et des enzymes hydrolysant plus spécialement des oligosaccharides ou des hétérosides du mannose, qu'on appelle mannosidases (α ou β).

Nous avons recherché ces enzymes dans la préparation extraite des semences germées de Fenugrec (Trigonella foenum graecum L. Légumineuses). N'ayant observé aucune hydrolyse du phényl- β -D mannoside et du β (1 $\rightarrow$ 4) mannobiose, nous avons conclu à l'absence de β mannosidase. En revanche, nous avons mis en évidence une β mannanase et une α mannosidase sur lesquelles ont porté nos recherches.

L'exposé de notre travail sera divisé en quatre parties.

La première partie sera consacrée à l'exposé sommaire des principales techniques que nous avons utilisées et à la description de la préparation de divers substrats classiques nécessaires à l'étude des différentes osidases.

La préparation et la séparation de quelques β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides et β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides réduits, ainsi que l'étude analytique des oligomannosides réduits comparativement aux oligomannosides homologues, feront l'objet de la seconde partie.

Ces divers substrats, phényl-mannosides, mannanes, β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides et β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides réduits ont été utiles pour étudier le mode d'action de la β mannanase qui constituera la troisième partie de notre thèse.

La purification et l'étude de l' α mannosidase seront exposées dans la quatrième partie. Nous y décrirons les conditions de séparation sur Sephadex G 200, les différents critères de pureté, et diverses propriétés (K_m , pH optimum, inhibiteurs ...) de l'enzyme.

Avant d'exposer nos résultats, nous tenons à remercier Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire. Nous ayant confié le sujet de notre thèse, il en a suivi le développement avec vigilance et sollicitude. Nous le remercions enfin d'avoir bien voulu présider le Jury de notre thèse. Nous le prions d'accepter l'expression de notre profonde gratitude et de notre respectueux attachement.

Nous remercions respectueusement Monsieur le Professeur P. FLEURY, qui a toujours montré beaucoup de bienveillance à notre égard.

Nous exprimons notre très profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur PERCHERON qui après nous avoir prodigué

ses encouragements et ses conseils si précieux tout au long de ce travail et nous avoir témoigné une grande bienveillance, a bien voulu faire partie de notre Jury.

Nous adressons notre respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur GUERNET qui nous a fait l'honneur de prêter attention à ce travail et d'accepter de le juger.

Enfin tous nos remerciements vont à Madame LANCHEC, Technicienne au C.N.R.S., qui nous aida dans la réalisation de nos expériences. Sa collaboration intelligente et efficace nous fut d'une aide précieuse. Nous l'assurons de notre amicale sympathie. Nous exprimons aussi tous nos remerciements à Monsieur DAVY, qui nous a initiée à la séparation des oligosaccharides sur colonne de charbon-célite. Nous assurons enfin de notre cordiale sympathie tous nos camarades du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris.

G E N E R A L I T E S

-O-O-O-

Dès 1899-1900, BOURQUELOT et HERISSEY ont remarqué que la fraction mannane des galactomannanes (dans lesquelles on sait maintenant que les unités mannose sont réunies par des liaisons osidiques β) était dépolymérisée par des enzymes présents dans les graines germées de Légumineuses : Caroubier, Fenugrec, Luzerne, Genêt commun (6)-(7)-(8).

Depuis, des β mannanases ont été trouvées dans de nombreux organismes : bactéries, champignons, algues, légumineuses, mollusques. Le tableau n° I donne la répartition des β mannanases. Il est à remarquer que c'est surtout dans la catégorie des champignons soit microscopiques, soit lignicoles, ou dans celle des légumineuses, que les β mannanases ont été le plus souvent trouvées.

Mais si les β mannanases ont été souvent identifiées dans le monde vivant, elles ont été peu étudiées, et comme le signalent COURTOIS et PERLES (25), nos connaissances sur ces enzymes demeurent bien sommaires. Des préparations non purifiées de β mannanases ont parfois été utilisées au cours de l'étude de la structure des polysaccharides mais, à notre connaissance, seuls REESE et SHIBATA (77) tentèrent de purifier

des β mannanases et d'étudier leur mode d'action sur divers polysaccharides.

Nous pensons que les raisons suivantes peuvent être invoquées pour expliquer le nombre limité de recherches sur la purification, le mode d'action et les propriétés des β mannanases :

- Les β mannanes de corozo, Phoenix canariensis, substrats par excellence des β mannanases, étant insolubles, la détermination des différentes propriétés (K_m , cinétique...) pose des problèmes.

- Les polysaccharidases, dans lesquelles entrent les β mannanases, semblent plus difficiles à purifier que les oligosaccharidases.

- Une conséquence de ce dernier facteur est qu'il est difficile d'obtenir des β mannanases exemptes d'autres osidases, en particulier α galactosidase et β glucosidase. Ceci empêche d'utiliser des substrats solubles et faciles à préparer, tels que les galactomannanes et les glucomannanes. Ces substrats seraient pourtant fort utiles pour étudier l'influence du degré de substitution des mannanes par des restes galactose ou de la présence d'unités glucose au sein des mannanes, sur la spécificité des mannanases.

Dans notre laboratoire, depuis plusieurs années, des travaux ont porté sur les β mannanes et les β mannanases (56). Précédemment COURTOIS et PERCHERON (23) ont constaté qu'une préparation enzymatique extraite des graines germées de Fenugrec hydrolysait une galactomannane en libérant non

TABLEAU N° I

Répartition de la β mannanase

BACTERIES

Aerobacter mannanolyticus

SATOSHI INNAMI (78)

Bacillus subtilis

REESE et SHIBATA (77)

CHAMPIGNONS

Microscopiques

Penicillium paxillus

COURTOIS, CARRERE et PETEK (19)

Penicillium chrysogenum

notatum

LYR et NOVAK (66)

Penicillium expansum

funiculosum

isariiiforme

ochro-chloron

REESE et SHIBATA (77)

piscarium

verruculosum

wortmanni

Taka-diastrase d'Aspergillus

orizae

COURTOIS, PETEK et KADA (26)

Aspergillus giganteus

lucluensis

REESE et SHIBATA (77)

Aspergillus fumigatus

nidulans

phoenicis

Fusarium culmorum

LYR et NOVAK (66)

oxysporum

Myrothecium verrucaria

Epicoccum yuccae

Fusicoccum sp.

Memnoniella echinata

Paecilomyces varioti

Lignicoles

Schizophyllum commune

Trametes versicolor

Fomes marginatus

Chaetomium globosum

Trichoderma viride

REESE et SHIBATA (77)

LYR (65)

ALGUES

Cladophora rupestris

Laminaria digitata

Rhodymenia palmata

Ulva lactuca

DUNCAN, MANNERS et ROSS (35)

VEGETAUX SUPERIEURS

Légumineuses

Guar(Cyamopsis Tetragonolobus) WHISTLER et SMITH (91)

Palmier (Phoenix canariensis) COURTOIS et LE DIZET (22)

Luzerne COURTOIS et LE DIZET (21)

Leucaena glauca HYLIN et SAWAI (53)

MOLLUSQUES

Huîtres

COURTOIS, PETEK et TO DONG(27)

seulement du galactose mais un disaccharide; connaissant la structure générale des galactomannanes, ceci laissait pressentir la présence, dans cette préparation enzymatique, d'une β mannanase. Nous avons mis en évidence cette β mannanase et avons étudié son mode d'action.

De nombreuses α mannosidases, ou α -D mannoside-mannohydrolases (E.C. :3-2-1-24), ont été signalées dans les champignons, les plantes, mais aussi dans le monde animal. CONCHIE et coll. ont très souvent mis en évidence ces enzymes chez les mammifères (13-14-16-17-57-58). A la suite des travaux de TRONCHET (86-87), des recherches sont aussi poursuivies dans notre laboratoire sur l' α mannosidase chez l'Homme. Le tableau N° II donne la répartition des mannosidases.

Seule dans le règne animal, l' α mannosidase de gastéropodes marins a été partiellement purifiée par MURAMATSU (67). Dans le règne végétal, LI (59-60) et GOLDBERG (42) purifièrent et étudièrent respectivement les α mannosidases de fève Jack et de semences d'asperge.

TABLEAU N° II

Répartition de l' α mannosidase

CHAMPIGNONS

<u>Aspergillus niger</u>	HERISSEY (50)
<u>Streptomyces griseus</u>	{ HERISSEY (50)
	{ HOCKENHULL et coll. (51)
	{ OTERO ABALO et REGUEIRO
	{ VARELA (72)

VEGETAUX SUPERIEURS

Asperge (semences) [Liliacées]	GOLDBERG (42)
Amandier (graines) [Rosacées]	{ HERISSEY (50)
	{ HELFERICH (46)
Luzerne (graines) [Légumineuses]	BOURQUELOT et HERISSEY (9)
Pois (graines) [Légumineuses]	TRONCHET (85)
Fève Jack (graines) [Légumineuses]	LI (59-60)
Café (graines) [Rubiacees]	HELPERICH et VORSATZ (48)

ANNELIDES

Ver de terre	LI et SHETLAR (61)
--------------	--------------------

MOLLUSQUES

Huître	COURTOIS et coll. (27)
Patelle	CONCHIE et LEVY (15)
Escargot	{ UTSUSHI et coll. (88)
	{ NAGAKA (69)
<u>Charonia lampas</u>	MURAMATSU (67)

ARTHROPODES

Insectes xylophages	COURTOIS et coll. (20)
---------------------	------------------------

MAMMIFERES

Rat - epididyme	CONCHIE et HAY (14)
- organes sexuels	CONCHIE, FINDLAY et LEVVY(13)
- foie et rate	{ CONCHIE et LEVVY (16)
	{ CONCHIE, FINDLAY et LEVVY(12)
- pancréas	CONCHIE, FINDLAY et LEVVY(12)
Homme - rein	CONCHIE, FINDLAY et LEVVY(12)
- sérum	TRONCHET (86-87)

P R E M I E R E P A R T I E

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

--oOo--

I - TECHNIQUES GENERALES =====

A) - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES.

Au cours de ce travail, les techniques chromatographiques, aussi bien d'adsorption, d'exclusion que de partage nous ont été d'un précieux secours.

1) - Chromatographie d'adsorption.

L'isolement des oligomannosides et oligomannosides réduits a été réalisé par adsorption sur colonne de charbon-célite selon TAYLOR et WHELAN (83).

2) - Chromatographie d'exclusion sur Sephadex.

Pour la préparation de ces corps, ainsi que pour l'obtention d' α mannosidase purifiée, nous avons utilisé la chromatographie d'exclusion sur Sephadex (principe du tamis moléculaire).

Ces deux techniques seront exposées dans le chapitre "Préparation et séparation de quelques $[\beta \text{ D (mannosyl) (1\rightarrow4)]}_n$ mannose et $[\beta \text{ D (mannosyl) (1\rightarrow4)]}_n$ mannitol", et "Etude de l' α mannosidase".

3) - Chromatographie sur papier.

Nous l'avons employée pour déceler les produits formés au cours de l'hydrolyse de divers substrats par nos enzymes et aussi pour vérifier la pureté des oligomannosides et oligomannosides réduits séparés sur colonne. Elle constitue une méthode de présomption rapide et commode. Il faut cependant signaler que la pureté et l'identification certaines d'un corps ne peuvent être assurées que par la détermination de ses constantes physiques où de sa structure.

Sous son aspect préparatif, elle nous a permis de parfaire la purification de certains oses et osides qui après chromatographie sur charbon, n'étaient pas encore totalement purs.

Nous ne donnerons pas de détails sur la chromatographie. Celle-ci a donné lieu à des articles généraux de DEDONDER (32), COURTOIS et PERCHERON (24), PERCHERON (75).

Nous nous bornerons à préciser certains points :

a) Choix du papier.

Celui-ci s'appuie sur plusieurs critères : résolution la meilleure possible des mélanges, temps de migration court, diffusion minimale des taches.

Parmi ceux que nous employons, le Whatman n° 4 est le plus rapide; 12 heures de migration suffisent pour séparer les hexoses en solvant n butanol - pyridine - eau (9 - 5 - 4 en vol.), mais les taches sont un peu diffuses. Les papiers Whatman n° 1, Arches 304, Schleicher et Schull sont plus lents.

36 h. à 48 h., pour la résolution des hexoses, dans le même solvant. La séparation est sensiblement meilleure. L'Arches 304 et le Schleicher et Schull sont d'épaisseur moyenne, nous les préférons au Whatman n° 1 beaucoup plus mince. Le Whatman n° 3 très épais nous sert pour la chromatographie préparative.

b) Mélanges solvants.

Nous avons employé deux solvants monophasiques :

- solvant I A (solvant alcalin)

n butanol - pyridine - eau (9 - 5 - 4 en vol.)

- solvant II A (solvant neutre)

n butanol - isopropanol - eau (1 - 7 - 2 en vol.)

avec lequel on obtient une meilleure séparation des penta et tétrasaccharides.

c) Technique.

Nous avons utilisé une technique monodimensionnelle, en général descendante, avec écoulement libre du solvant, en bas de la feuille, à cause de la migration lente des osides, quelquefois ascendante, si l'on veut comparer la migration des homologues d'une même série.

d) Révélateurs.

Ceux-ci sont choisis d'après les corps à révéler :

α) Osés et osides réducteurs.

On utilise l'aptitude du corps à former, par chauffage, avec les acides fixes, des dérivés furfuraliques qui peuvent être condensés avec des amines ou des phénols pour donner des produits colorés. Sur ce principe sont basés

- Révélateur à la β -naphtylamine et au thymol, proposé par NOVELLIE (71), modifié par PETEK (76). En principe, seuls les sucres réducteurs réagissent, cependant l'acidité du milieu est assez grande pour hydrolyser les liaisons osidiques fragiles telles que celles des fructofuranosides comme le saccharose, qui donnent une réaction positive.

Nous préférons révéler les chromatogrammes par immersion, plutôt que par pulvérisation, pour éviter l'inhalation de β -naphtylamine, connue pour ses propriétés cancérigènes.

- Révélateur à l'o-phénylène-diamine (31).

Ce révélateur a l'avantage d'être plus sensible pour les oligosaccharides de poids moléculaire égal ou supérieur aux trisaccharides.

β) Osés et osides réducteurs ou non réducteurs.

Une partie importante de notre travail portant sur les itols, nous avons eu souvent recours à ces révélateurs.

Nous avons utilisé :

- Le réactif au tétracétate de plomb (10).

Le tétracétate de plomb est préparé suivant la technique de DIMROTH et SCHWEITZER (33). Nous l'employons en

solution dans l'éthanol absolu, plus aisée à pulvériser. La moindre trace d'eau, provoquant l'hydrolyse empêche la coloration. La solution ne peut donc être gardée que quelques minutes à cause de l'humidité de l'air. Les glucides donnent des taches blanches sur fond jaune.

- Le nitrate d'argent en milieu alcalin, suivant la modification de TREVELYAN (84). C'est un réactif très sensible des glucides, mais il présente l'inconvénient de révéler aussi d'autres corps. Comme la révélation comporte une pulvérisation avec une solution sodique, on a avantage à ne pas choisir un papier fin qui se déchire.

γ) Oligosaccharides à liaison (1→4).

Pour mettre en évidence les oligosides comportant des liaisons 1→4, nous disposons de deux réactifs :

- Révélateur à la diphénylamine-aniline, en utilisant la technique de BAILEY et BOURNE (5). La composition du réactif est la suivante :

diphénylamine.....	4 g
aniline.....	4 ml
H ₃ PO ₄ à 80%.....	20 ml
acétone.....	200 ml

Après pulvérisation, le chromatogramme est chauffé 4 minutes à 80°C. Les β (1→4) osides donnent des taches bleues, le mannose et le galactose des taches grises.

- Révélateur à la diphénylamine-urée (4).

Il comporte deux solutions à mélanger à volumes égaux :

- une solution de diphénylamine à 2% (P/V), dans l'acétone contenant 10% d'acide phosphorique;
- une solution d'urée à 3% (P/V) dans le butanol saturé d'eau contenant 10% d'acide phosphorique.

L'auteur préconise un chauffage 4 mn à 5 mn à l'étuve à 95°C ou 100°C. De cette façon, nous n'avons pas obtenu des colorations très nettes. Aussi avons-nous adopté les conditions suivantes : nous pulvérisons le mélange, laissons sécher le chromatogramme à l'air 10 à 15 minutes, afin d'éliminer l'acétone, le chauffons 4 à 5 minutes à 100°C. Tous les oses donnent des taches mauve violet. Vingt à trente minutes après le chauffage les oligosaccharides liés en 1-4 se colorent en brun. La coloration brune est renforcée, si l'on met de nouveau le chromatogramme 1 à 2 minutes à 100°.

4)- Chromatographie sur couches minces.

La chromatographie sur couches minces a été appliquée à la séparation de nombreux corps. On trouve une bibliographie très complète dans le manuel de STAHL (81).

Les oses et oligosaccharides semblent constituer un domaine défavorable par rapport à de nombreuses séries de composés. Les travaux originaux pour les glucides furent ceux de STAHL, qui utilise un support de Kieselguhr G (82).

Le développement de l'utilisation de cette technique par les différents laboratoires, les avantages que les divers auteurs lui attribuaient (rapidité...) nous ont amenée à l'utiliser. Les divers solvants publiés ne nous ont pas permis une

bonne séparation de nos produits. Aussi avons-nous étudié plusieurs mélanges solvants. Voici les conditions opératoires que nous avons mises au point (45) :

a) Support.

A la suite d'essais pratiqués simultanément sur Kieselguhr G et Kieselgel G, nous avons préféré le Kieselgel G. Avec nos solvants, les taches sur Kieselgel G sont beaucoup plus nettes, et plus délimitées, alors que nous observons des traînées sur Kieselguhr G.

L'épaisseur du support est de 0,25 mm. Les plaques sont activées par un séjour de 30 mn, à l'étuve à 100°.

b) Solvant.

Nous avons retenu les mélanges suivants :

Solvant I B : n butanol - méthanol - eau (5 - 3 - 1 en vol.)

" II B : n butanol - isopropanol - eau (1 - 7 - 2 en vol.)

" III B : n butanol - isopropanol - eau (5 - 3 - 1 en vol.)

c) Migration.

Pour assurer une bonne saturation de l'atmosphère des cuves par les vapeurs de solvant, nous appliquons le long de trois parois, un papier filtre dont la base plonge dans le mélange solvant.

Avec les plaques de 20 x 20 cm, la partie supérieure est atteinte par ces solvants en une durée variant de 3 à 5 heures, suivant la température de la pièce.

Pour certaines séparations, une simple migration suffit; pour d'autres, nous avons recours à un double développement : première chromatographie, séchage de la plaque sous

courant d'air tiède et deuxième migration dans le même solvant.

d) Révélateurs.

Nous utilisons :

- soit le tétracétate de plomb
- soit la β -naphtylamine
- soit plus simplement une solution d'acide sulfurique à 5% dans le méthanol, qui après chauffage, fait apparaître les oses sous forme de taches gris noir.

Sur le tableau n° III, et sur la figure n° 1, nous remarquons que la séparation des glucides tels que rhamnose, glucose, saccharose, raffinose, stachyose, est tout à fait satisfaisante. Par contre les couples galactose - saccharose et lactose - raffinose ne sont pas bien séparés et la résolution des différents hexoses n'est pas très bonne.

Cette technique nous a été très utile pour séparer les oligomannosides provenant d'hydrolysats. Elle est en effet rapide, et la présence de sels ne gênant pas, elle permet de chromatographier un hydrolysat non déminéralisé. Nous verrons dans le chapitre "Mode d'action de la β mannanase", qu'elle nous a permis de séparer les couples mannobiose - mannobiitol et mannotriose - mannotriitol, ce que nous n'avions pu réaliser sur papier.

B) - OXYDATION PERIODIQUE.

Cette méthode est exposée et discutée dans les revues générales telles que celles de COURTOIS (18). Nous l'avons employée pour déterminer la structure des oligomannosides

T A B L E A U I I I

Rg x 100

G l u c i d e s	n-butanol-méthanol-eau 5/3/1		n-butanol-isopropanol-eau 5/3/1	
	simple développement	double développement	simple développement	double développement
Stachyose.....	31	38	10	8,9
Raffinose.....	59	64	26	30
Lactose.....	66	71	37	40
Saccharose.....	92	94	75,5	78
Galactose.....	87	91	80	82
Glucose.....	100	100	100	100
Mannose.....	98	99	106	104
Fructose.....	89	91	91	91
Arabinose.....	92	93	92	93
Rhamnose.....	121	112	137	126

réduits, comparativement à celle des oligomannosides.

L'oxydation du corps est faite dans les conditions habituelles à pH 2, par un large excès d'acide periodique, à 0°C, et à l'obscurité de façon à réduire au maximum les réactions secondaires. La cinétique de la réaction est suivie au bout de 15, 30, 60 mn, puis 1, 2, 3 et 8 jours. On effectue en même temps un témoin de l'oxydation.

1) Détermination de l'acide periodique consommé, suivant la technique de FLEURY et LANGE (38). L'acide periodique non consommé réagit sur les iodures alcalins en milieu bicarbonaté, pour libérer de l'iode. L'iode est alors titré par un excès d'une solution d'anhydride arsénieux. Cet excès est titré par iodométrie.

2) Détermination de l'acidité apparue.

Elle se fait suivant la technique de GUERNET (44), par une solution titrée de soude, avec comme indicateur un mélange de rouge de méthyle et bleu de méthylène.

Dans le dosage, l'acidité est composée

- des acides libres apparus
- de l'acide periodique non consommé
- de l'acide iodique formé par réduction de l'acide periodique.

En traitant le dosage et le témoin par l'éthylène-glycol, il y a réduction de l'acide periodique en acide iodique. Dans le dosage, nous avons donc seulement acide iodique et acides apparus, et dans le témoin acide iodique. La différence entre les deux essais correspond donc aux fonctions acides

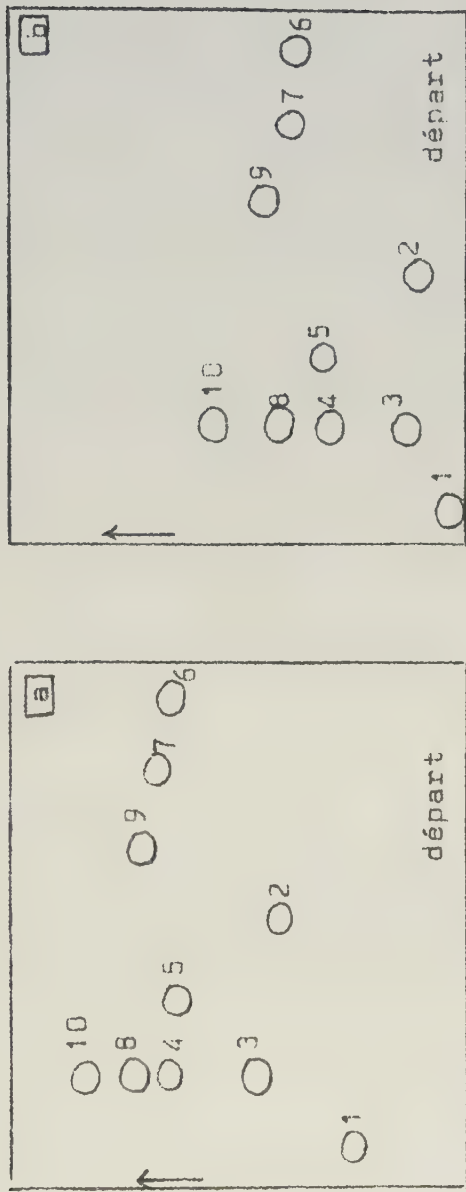


Figure n° 1

Séparation de quelques oses et osides par chromatographie sur couche mince

a) Solvant : n butanol-méthanol-eau 5/3/1 en vol. b) Solvant : n butanol-isopropanol-eau 5/3/1 en vol.

1 : Stachyose

2 : Raffinose

3 : Lactose

4 : Saccharose

5 : Galactose

6 : Fructose

7 : Arabinose

8 : Glucose

9 : Mannose

10 : Rhamnose

apparues.

3) Détermination de l'aldéhyde formique.

Le formaldéhyde est dosé suivant la technique d'EEGRIVE (36), par colorimétrie de son produit de condensation avec l'acide chromotrope.

Certains auteurs distillent l'aldéhyde formique afin d'éviter les colorations développées entre les ions iodate ou periodate et l'acide chromotrope et emploient une gamme étalon d'aldéhyde formique. Nous préférons faire la gamme à partir du formaldéhyde libéré par oxydation periodique d'érythritol, ainsi nous sommes dans les mêmes conditions que pour le dosage, en présence d'iodate et de periodate, dont l'interférence éventuelle dans le dosage serait la même dans tous les cas.

C) - DOSAGE DES GLUCIDES

1) Réaction à l'anthrone.

Cette réaction proposée par DREYWOOD (34) est basée sur le principe suivant : par chauffage en milieu sulfurique concentré hydrolyse des osides en oses, transformation des oses en furfural, et condensation de ce dérivé avec l'anthrone.

A la différence de la technique de NELSON-SOMOGYI (70)-(79) la réaction à l'anthrone hydrolysant les osides, permet de doser les osides non réducteurs.

Nous utilisons cette réaction :

a) sous son aspect qualitatif, pour localiser les oses et avoir une estimation approximative de leur concentration

dans les éluats de colonne. Dans ce cas, il est inutile de faire une gamme étalon. Nous suivons le procédé décrit par DAVY (31). Il est à signaler que le réactif doit être fait avec de l'acide sulfurique R.P. ou Merck, certains autres dits purs conduisant à un réactif brun foncé inutilisable.

b) sous son aspect quantitatif, pour le dosage des unités glucidiques dans les oligosaccharides. Nous utilisons alors la technique décrite par SPIK et MONTREUIL (80).

2) Technique de NELSON-SOMOGYI (70) (79).

Le dosage s'effectue en deux étapes :

1) le réactif cupro-alcalin de SOMOGYI est réduit à l'ébullition par l'ose ou par la partie réductrice du saccharide, en oxyde cuivreux. La grande quantité de sulfate de sodium contenue dans le réactif empêche sa réoxydation.

2) L'oxyde cuivreux formé réduit ensuite le réactif arséniato-molybdique de NELSON, en dérivés molybdeux bleus.

L'intensité de la coloration est mesurée à 650 nm.

Nous ne décrirons pas la technique, mais mentionnerons quelques remarques :

1) La réaction n'est pas stoechiométrique. Il faut donc suivre exactement les conditions établies.

2) Chaque ose a un pouvoir réducteur différent vis à vis du réactif, ce qui oblige à réaliser une gamme avec le même ose que celui qu'on désire doser. Ceci est également valable pour les disaccharides réducteurs, dont le pouvoir réducteur n'est pas exactement la moitié de celui de l'hexose correspondant. C'est un inconvénient pour le dosage de

mélanges de glucides ou lors de l'étude de l'hydrolyse enzymatique d'un disaccharide.

3) La réduction en oxyde cuivreux n'a lieu qu'en milieu alcalin. Si la solution de glucides à doser est trop acide (c'est le cas pour les essais à pH bas, dans la détermination du pH optimum d'une osidase), il est nécessaire d'ajouter de la soude à la solution.

4) Enfin la réaction est inhibée par la présence de certains sels, tels que le chlorure mercurique.

D) - DOSAGE DES PHENOLS.

Nous avons souvent eu recours au dosage de ces corps. En effet, nous mesurons l'activité des différentes osidases sur les phényl-osides ou les nitrophényl-osides correspondants qu'elles hydrolysent en libérant le phénol ou le nitrophénol, suivant le substrat utilisé.

1) Dosage du phénol.

Le phénol libre en milieu alcalin absorbe fortement à 280 nm, tandis que l'absorption des phényl-osides dans cette région est très faible (3). On compare à une solution étalon de phénol. La loi de BEER-LAMBERT est respectée entre 0 et 300 μ moles/l.

2) Dosage du nitrophénol.

En milieu alcalin le p.nitrophénol est fortement coloré en jaune alors que les nitrophényl-osides sont incolores. Cette méthode est donc très précieuse pour suivre l'hydrolyse de ces substrats. Nous suivons les conditions

recommandées par CONCHIE (12) : le milieu est additionné d'un volume égal de tampon glycine-soude 0,4 M, pH : 10,8; la lecture est faite à 430 nm.

E) - DOSAGE DES PROTEINES.

1) Par absorptiométrie à 280 nm.

Nous avons utilisé cette méthode uniquement pour localiser les protéines et avoir une estimation approximative de leur concentration dans les éluats. Dans ce cas, nous ne faisons pas de gamme étalon. La courbe est obtenue par enregistrement continu grâce à un "absorptiomètre automatique G.M.E. 280 I F".

2) Par réfractométrie.

Une table (LOISELEUR 63), indique le taux de protéines contenues dans le sérum par rapport aux lectures réfractométriques.

3) Par la méthode au biuret.

Par rapport à une gamme étalon de caséine. Ce dosage fut possible pour certaines solutions protéiques, mais non pour la solution enzymatique de Fenugrec. On obtient avec celle-ci une teinte verdâtre, accompagnée d'un précipité.

4) Par la méthode de LOWRY (64).

L'étalonnage est fait avec de l'albumine bovine BEHRING, dont les caractères sont les suivants : 100% pure

en électrophorèse; azote : 15,90%; cendres : 0,25%; glucides : 0,17%; humidité : 0,30%.

Nous apportons une modification qui écarte tout risque de précipitation dans la préparation du réactif B : nous dissolvons 0,500 g de tartrate de sodium et de potassium dans une fiole jaugée de 100 ml; d'autre part nous dissolvons 0,500 g de $\text{Cu SO}_4, 5 \text{ H}_2\text{O}$ dans un becher. Nous additionnons le tartrate de la plus grande quantité possible d'eau et ajoutons le sulfate de cuivre peu à peu et en agitant. Le réactif doit être préparé au moment du besoin. Nous lisons la coloration à 700 nm.

5) Par la méthode de KJELDAHL, selon PARNAS et WAGNER (74).

Toutes ces techniques présentent l'inconvénient de comparer arbitrairement les protéines à doser soit à celles du sérum, soit à une autre protéine, caséine, albumine humaine ou autres.

II - PREPARATION DE SUBSTRATS CLASSIQUES

POUR L'ETUDE DE DIVERSES OSIDASES

A) SUBSTRATS NECESSAIRES POUR L'ETUDE DE LA β MANNANASE.

1) La β (1 $\rightarrow$ 4) mannane de Phoenix canariensis, préparée à partir des noyaux, suivant le procédé décrit par LE DIZET (56), avec une modification : la β mannane est extraite par de la soude, avec agitation, afin d'augmenter le rendement et sous un courant d'azote, pour éviter l'oxydation par l'air.

On procède successivement à :

- un concassage des noyaux, au broyeur à marteaux, puis au broyeur-mixeur B 17.
- un tamisage qui permet de séparer à côté des débris de tégument, une poudre provenant de l'albumen, et contenant la mannane.
- une délipidation de la poudre à l'éther.
- une dialyse afin d'éliminer les oligosaccharides solubles (saccharose).
- des extractions par la soude (3 fois par la soude 2 N, 4 fois par la soude 5 N), avec agitation, et sous courant d'azote.

- une précipitation de la mannane brute par l'éthanol, après neutralisation par l'acide acétique suivie de dialyse,
- la purification de la mannane, par précipitation, en milieu alcalin, de son complexe cuprique (2). Seuls les polysaccharides à mannose (mannanes, glucomannanes, galactomannanes) donnent un complexe insoluble. La mannane est régénérée par addition d'acide chlorhydrique 2 N. Bien que les mannanes soient des grosses molécules assez solides, l'opération est conduite rapidement et à froid, afin d'éviter tout risque d'épimérisation par la soude et tout risque d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique.

2) - La β (1 $\rightarrow$ 4) mannane de Corozo,

suivant le même procédé que précédemment, aux différences près ci-dessous :

- 1) Les noix de Corozo étant plus dures et plus grosses que les noyaux de Phoenix canariensis, nous avons dû les faire concasser dans les broyeurs industriels.*
- 2) Les oligosaccharides n'ont pas été éliminés par dialyse, mais par extraction à reflux, à l'alcool à 80° qui extrait en même temps les saponosides.
- 3) La mannane a été purifiée uniquement par plusieurs précipitations alcooliques.

3) - Le phényl β -D mannoside,

préparé suivant la méthode classique d'HELFERICH et

* Ceci fut exécuté par les Etablissements FEVRIER DECOISY CHAMPION (Paris), grâce à M. GENET. A celui-ci, ainsi qu'à M. CALVET, qui nous envoya un lot de poudre de Corozo, nous adressons nos plus vifs remerciements.

SCHMITZ-HILLEBRECHT (47), dont les stades sont les suivants :

- obtention de penta-O-acétyl β -D mannose (52)
- traitement de ce dérivé par le phénol qui remplace le groupement acétyl fixé au carbone réducteur, par un groupement phényl, pour donner les phényl-tétra-O-acétyl mannopyranosides α et β (49). Séparation des deux isomères par cristallisation fractionnée.
- désacétylation par le méthylate de sodium.

Certains points de cette préparation méritent d'être précisés :

- 1) L'acétylation du mannose est très exothermique. Il faut éviter toute élévation de la température qui dégraderait le mannose. Néanmoins il est nécessaire d'amorcer la réaction à la température du laboratoire. Dès l'amorçage de celle-ci on la ralentit en plongeant le récipient dans l'eau glacée et on contrôle ainsi la réaction, jusqu'à dissolution complète du mannose.
- 2) Avec les autres oses que le mannose, l'addition, au stade de la phénylation, d'acide p. toluène sulfonique conduit au dérivé β , l'addition de Zn Cl_2 à température plus élevée conduit au dérivé α . Avec le mannose, il se forme avec Zn Cl_2 , un mélange d'hétérosides α et β , qui peuvent être séparés seulement par cristallisation fractionnée. Théoriquement, le dérivé β cristallise à la température du laboratoire, le dérivé α à $+4^\circ$, mais l'obtention des produits purs demande plusieurs cristallisations. La pureté des deux dérivés doit être vérifiée par détermination de leur point de fusion et

de leur pouvoir rotatoire.

4)- β (1-4) oligomannosides et β (1-4) oligomannosides réduits.

Leur préparation fera l'objet d'un chapitre particulier.

B) SUBSTRATS NECESSAIRES POUR L'ETUDE DE L' α MANNOSIDASE.

1)- Le phényl α -D-mannoside.

Il est préparé en même temps que le phényl β -D-mannoside (voir préparation de ce substrat).

2)- Le p. nitrophényl α -D-mannoside.

préparé suivant la technique de JERMYN (54) et WESTPHAL et FEIER (89), exposée dans "Methods in Carbohydrate Chemistry", vol. II, p. 346. Nous y avons apporté quelques modifications.

Le principe de la préparation est semblable à celui suivi pour les phényl-osides : acétylation, phénylation par du nitrophénol (au lieu de phénol), désacétylation. On emploie Zn Cl_2 comme catalyseur de la phénylation, à 140° . Contrairement aux phényl-tétra-O-acétyl mannopyranosides, seul le dérivé α est obtenu.

La technique est la suivante :

a) préparation du penta-O-acétyl- β -D-mannose.

b) préparation du p.nitrophényl-tétra-O-acétyl- α -D-mannopyranoside.

Les auteurs réalisent la phénylation pendant 30

minutes, à 160° , à la pression normale. Nous avons à ce stade effectué quelques modifications et avons adopté un protocole opératoire voisin de celui suivi pour la préparation des phényl-tétra-O-acétyl mannopyranosides.

Le protocole opératoire que nous avons adopté est le suivant :

- 25 g de penta-O-acétyl- β -D mannose, 25 g de p. nitrophénol et 2 g de Zn Cl_2 sont mélangés dans un ballon de 500 ml muni d'un réfrigérant et relié à une trompe à eau. La réaction s'effectue à 140° , pendant 2 heures, sous pression réduite.
- Après refroidissement vers 60° , le produit de la réaction est extrait par le benzène qui dissout en même temps une partie du p. nitrophénol mis en excès.
- La solution benzénique est lavée à l'eau, puis à la soude qui extrait le p. nitrophénol.
- Quand tout le p. nitrophénol est éliminé, la solution sodique cesse de se colorer. La solution benzénique est alors lavée à l'eau jusqu'à neutralité.
- Après déshydratation sur Ca Cl_2 , la solution benzénique est évaporée sous pression réduite.
- Le résidu sirupeux est dissous dans l'alcool absolu, décoloré par le charbon et cristallisé.

c) préparation du p.nitrophényl α -D-mannoside.

Nous utilisons la même technique que pour le phényl α -D-mannoside.

C) SUBSTRATS POUR L'IDENTIFICATION DES AUTRES OSIDASES
ACCOMPAGNANT LA β MANNANASE ET L' α MANNOSIDASE DANS
L'EXTRAIT ENZYMATIQUE DE FENUGREC.

Il s'agit surtout de phényl-osides :

- phényl α -D glucoside
- phényl α -D galactoside
- phényl β -D galactoside.

Nous avons déjà donné le principe de leur préparation.

DEUXIEME PARTIE

I - PREPARATION ET SEPARATION DE QUELQUES β (1 $\rightarrow$ 4)

OLIGOMANNOSIDES OU $[\beta\text{-D MANNOSYL (1}\rightarrow\text{4)}]_n$ MANNOSE

II - PREPARATION, SEPARATION ET ETUDE DE QUELQUES β (1 $\rightarrow$ 4)

OLIGOMANNOSIDES REDUITS OU $[\beta\text{-D MANNOSYL (1}\rightarrow\text{4)}]_n$

MANNITOL.

--oOo--

Afin d'étudier le mode d'action de la β mannanase, nous avons dû préparer quelques β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides et β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides réduits. La préparation et la séparation des β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides sont différentes de celles employées jusqu'ici. Quant à la séparation des β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides réduits, à notre connaissance, elle n'a jamais été décrite. En outre, une étude analytique des β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides réduits, comparativement aux β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides, est effectuée.

I - PREPARATION ET SEPARATION DES β (1 $\rightarrow$ 4) OLIGOMANNOSIDES OU [β -D MANNOSYL (1 $\rightarrow$ 4)]-n-MANNOSE.

Ces corps ont déjà été obtenus en faibles quantités dans notre laboratoire par COURTOIS et LE DIZET (22) et par DALOUL (29). Mais comme nos expériences nécessitaient l'emploi de quantités plus importantes, nous avons dû en préparer. Nous avons mis au point un procédé différent de préparation, qui semble présenter certains avantages.

DALOUL obtient le mélange des β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides par hydrolyse sulfurique de la glucomannane de Salep. Il les sépare par chromatographie sur colonne de charbon-célite, suivant la technique de WHISTLER et DURSO (90), en utilisant divers paliers alcooliques, l'éthanol à 2,5° éluant le β manno-
biose, l'éthanol à 5° éluant le β mannotriose.

COURTOIS et LE DIZET préparent ces corps par hydrolyse sulfurique de la mannane de Phoenix canariensis. Ils chromatographient l'hydrolysat sur colonne de charbon-célite, éliminent

les oses simples par l'eau, récupèrent les oligomannosides par élution à l'alcool et les fractionnent par chromatographie préparative sur papier.

Nous avons préparé et surtout isolé ces substrats par une autre technique décrite ci-dessous.

A - PREPARATION DES OLIGOMANNOSIDES.

Ceux-ci furent préparés de plusieurs façons. Nous avons obtenu avec les divers procédés, les mêmes corps.

Un premier lot a été fabriqué par hydrolyse enzymatique de la mannane de Phoenix canariensis par la β mannanase de Fenugrec.

Mais l'hydrolyse enzymatique présente certains inconvénients :

1) il faut obtenir les oligomannosides exempts de la protéine enzymatique. Pour cela, il est nécessaire soit de déféquer l'hydrolysât par l'acétate basique de plomb, soit de le dialyser. Par cette dernière méthode, on récupère les sucres dans les eaux de dialyse, qu'il faut concentrer.

2) l'hydrolyse enzymatique se faisant en milieu tamponné, les glucides sont accompagnés de sels en grande quantité.

3) elle nécessite une assez grande quantité d'enzyme long à préparer.

4) enfin, nous avons l'intention d'utiliser ces

oligomannosides pour étudier le mode d'action de la β mannanase de Fenugrec. Il est donc préférable de les préparer autrement que par hydrolyse enzymatique avec ce même enzyme.

Nous avons ensuite procédé par hydrolyse acide partielle. Dans un premier temps, nous avons hydrolysé de la mannane de corozo. Ensuite, nous avons hydrolysé la poudre de corozo simplement dégraissée au benzène et débarrassée des divers oligosaccharides et saponosides par extraction à l'alcool à 80°. Les résultats furent identiques.

Des essais avec différents acides furent exécutés : nous avons d'abord utilisé HCl et H_2SO_4 0,5 N, puis H_2SO_4 0,01 N; ceux-ci ont été écartés, car une isomérisation possible des oligosaccharides a été signalée, particulièrement avec HCl (55).

L'acide formique à 10% a lui aussi été abandonné, car il est difficile à éliminer et nécessite pour cela l'emploi de résines. Nous avons choisi finalement l'acide oxalique, facile à éliminer en fin d'hydrolyse.

Nous avons adopté le procédé suivant :

30 g de poudre de corozo, préalablement traitée par le benzène et l'alcool, sont chauffés sous agitation avec 600 ml d'acide oxalique N. On précipite l'acide oxalique à l'état d'oxalate de calcium, on centrifuge et on concentre le surnageant sous pression réduite. La poudre récupérée par filtration est à nouveau traitée 2 fois d'une manière identique.

B - ISOLEMENT DES OLIGOMANNOSIDES.

1) Principe.

La séparation a lieu sur colonne de Sephadex G-25, suivant FLODIN (39) (40). Selon le principe du tamis moléculaire, les grosses molécules sont éluées en premier, alors que les molécules à poids moléculaire plus faible sont retardées. A la sortie de la colonne, les divers oligomannosides ne sont pas entièrement purifiés; la purification est achevée par chromatographie sur papier. Mais le passage sur Sephadex G-25 constitue une prépurification, qui permet de réduire considérablement le nombre de chromatogrammes. D'autre part, les volumes d'élution des oligomannosides sur Sephadex sont bien inférieurs à ceux obtenus sur colonne de charbon-célite, par élution avec des alcools à titre croissant, ce qui diminue beaucoup le temps de concentration des solutions, par distillation.

2) Technique.

Nous employons une colonne de 1,8 cm de diamètre remplie sur une hauteur de 1 m.

Le Sephadex G-25 est mis à gonfler une nuit, dans de l'eau additionnée de 1% de n.butanol, afin d'éviter le développement des moisissures. Le lavage et l'élution de la colonne sont effectués avec le même liquide.

Nous déposons à la surface de la colonne 0,900 g d'hydrolysate. Nous recueillons sur collecteur automatique des

fractions de 5 ml. La détection des oses est faite grâce à la réaction à l'anthrone. La présence de n.butanol faisant varier la teinte de la coloration, il est judicieux de faire le témoin en présence de n.butanol.

C - CARACTERES DES OLIGOMANNOSIDES.

Le β mannobiose est cristallisé dans le méthanol additionné de quelques gouttes de n.butanol. On obtient alors sa forme anhydre (F : 189° - 190° non corrigé).

Le β mannotriose est cristallisé en solution éthanolique maintenue quelques heures à l'ébullition à reflux. Il se présente sous la forme trihydrate (F : 133° - 135° non corrigé).

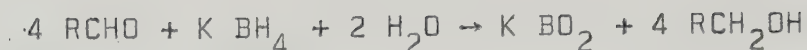
La plupart des propriétés des oligomannosides sont connues. Nous avons étudié uniquement celles qui permettaient de faire une comparaison entre les oligomannosides et leurs homologues réduits. L'ensemble sera exposé dans le paragraphe "Etude analytique des oligomannosides réduits".

II - PREPARATION, SEPARATION ET ETUDE DES OLIGOMANNOSIDES REDUITS DU $[\beta\text{-D MANNOSYL (1\rightarrow4)]_n$ MANNITOL.

A - PREPARATION DES OLIGOMANNOSIDES REDUITS.

Nous réduisons au borohydrure de potassium, le mélange des oligomannosides obtenus par hydrolyse acide de la poudre de corozo.

La réduction a lieu suivant la réaction :



54 g de KBH_4 réduiront donc 4 équivalents aldéhydiques. Nous employons un large excès de borohydrure.

Nous déterminons le nombre moyen de groupements réducteurs par la méthode de NELSON-SOMOGYI, par comparaison à une gamme étalon de mannose. Cette détermination n'est qu'approximative, les différents oligomannosides donnant pour le même nombre de groupements réducteurs des intensités de coloration un peu différentes.

L'hydrolysate est mis en contact avec du borohydrure de potassium durant trois jours, puis neutralisé par HCl . La solution est alors agitée avec de l'Amberlite IR 45 (OH^-) et avec de la Permutite 50. L'éluat est concentré sous vide. L'acide borique est éliminé ensuite par évaporation sous vide de son ester volatil, le borate de méthyle.

Afin de contrôler cette expérience, nous faisons deux chromatogrammes, à partir de la solution d'oligomannosides réduits :

- Sur l'un révélé à la β naphtylamine, réactif des saccharides réducteurs, aucune tache n'apparaît. Ceci prouve que les β oligomannosides ont été entièrement réduits.

- Sur l'autre révélé au tétracétate de plomb on observe une tache ayant le même R_g que le mannitol et trois autres taches ayant des R_g inférieurs. Ces trois taches correspondraient au β mannobitol, β mannotriitol et β mannotétraïtol.

B - SEPARATION DES OLIGOMANNOSIDES REDUITS.

1) Principe.

Nous utilisons les méthodes préconisées par TAYLOR et WHELAN (83) et par DAVY (31) : chromatographie sur colonne de charbon-célite avec élution par un gradient éthanolique additionné d'acide formique qui améliorerait la séparation. A la fin de notre travail, nous avons d'ailleurs abandonné l'utilisation de l'acide formique qui donne en définitive une amélioration minime, par rapport aux complications qu'il crée. Nous verrons plus loin que les courbes d'élution des oligomannosides, avec et sans acide formique, sont peu différentes.

Cette méthode présente plusieurs avantages par rapport à la méthode de WHISTLER et DURSO (90).

1) le lavage du charbon et de la célite se fait uniquement à l'eau, par décantations successives. Le lavage du charbon par l'acide acétique, puis par l'eau, de WHISTLER et DURSO, et le séchage à 100° du charbon et de la célite sont ainsi évités. La préparation de la colonne est donc beaucoup plus rapide.

2) l'élution grâce à un gradient

- est beaucoup plus rapide : 36 heures au lieu de plusieurs semaines et élimine de ce fait les risques de développement de moisissures;
- évite de tâtonner pour savoir le degré alcoolique exact auquel un corps est élué;

- évite les volumes considérables d'élution utilisés avec la méthode de WHISTLER et DURSÖ. En effet, avec cette dernière, il est nécessaire d'éluer la totalité de l'oligosaccharide, avant de changer le degré alcoolique, autrement il y a un chevauchement de pics. Ces lavages prolongés entraînent une très grande dilution des saccharides qui deviennent de ce fait difficiles à caractériser; de plus ces gros volumes sont longs à concentrer. Au contraire, avec un gradient, la concentration des saccharides en solution est élevée; le plus souvent quelques gouttes de solution suffisent pour la caractérisation des saccharides.

2) Technique. Mise au point de différents facteurs pour la chromatographie des oligomannosides réduits.

a) L'adsorbant,

est constitué d'un mélange de

- (- charbon DARCO G.60..... 22,5 g
-)
- (- célite..... 22,5 g

Chaque poudre est lavée séparément à l'eau par décantations successives qui éliminent les particules trop fines qui pourraient colmater la colonne. Plusieurs marques de charbon ont été essayées , c'est le charbon DARCO G.60 qui nous donna les meilleurs résultats.

b) Caractéristiques et conditionnement de la colonne.

Après plusieurs essais, nous avons choisi une colonne de 2,5 cm de diamètre et de 70 cm de haut.

Le mélange charbon-célite est versé en une seule fois dans la colonne dont la partie inférieure a été préalablement garnie d'un tampon de coton de verre et d'une couche de sable recouverte d'un disque de papier filtre. Un tampon de matière plastique spongieuse protège la surface supérieure du mélange adsorbant, afin que celle-ci ne soit pas perturbée par le liquide d'élution ou par l'application de l'échantillon. Nous avons constaté qu'une telle colonne permet le fractionnement de 1.5 g d'hydrolysats sec.

Les flacons d'alimentation sont placés à 1,5 m au-dessus de la colonne, afin d'augmenter légèrement la pression.

c) Liquides d'élution.

A Pour les premières colonnes, nous avons utilisé:

- l'acide formique 0,01 N qui élue le mannitol,
 - ensuite un gradient éthanolique à 15% d'éthanol.
- dans l'acide formique 0,01 N, qui élue successivement les différents oligomannosides réduits.

B Puis, devant les inconvénients qu'il crée, par rapport à l'amélioration qu'il apporte pour la séparation, nous avons abandonné, pour les dernières colonnes, l'acide formique.

Nous avons alors employé :

- l'eau pour éluer le mannitol
- un gradient éthanolique à 15% pour éluer les divers oligomannosides réduits.

d) Choix du gradient.

Nous avons porté notre choix sur un gradient exponentiel et avons pour cela utilisé le montage décrit par ALM, WILLIAMS et TISELIUS (1). Celui-ci est composé d'un flacon mélangeur étanche A, rempli du solvant initial (ici de l'acide formique 0,01 N ou de l'eau); il est muni de deux tubulures, l'une allant vers la colonne à chromatographie, l'autre provenant d'un flacon d'alimentation B, de forme quelconque, contenant l'éluant à la concentration choisie (ici éthanol dans l'acide formique 0,01 N).

Après plusieurs essais, nous avons adopté les conditions suivantes :

- 800 ml d'acide formique 0,01 N ou d'eau dans le flacon A,
- 2.000 ml d'éthanol à 15% dans l'acide formique 0,01 N ou dans l'eau, dans le flacon B.

e) Localisation des différents pics.

A Au début nous avons eu recours à la réaction à l'anthrone. Celle-ci étant négative avec le mannitol, nous avons dû utiliser la chromatographie sur papier, pour localiser le mannitol, avant de disposer le gradient.

B Après l'acquisition d'un polarimètre BENDIX-ERICSSON, nous avons pu enregistrer en continu la déviation polarimétrique des éluats.

Sur la figure n° 2, les courbes B donnée par la

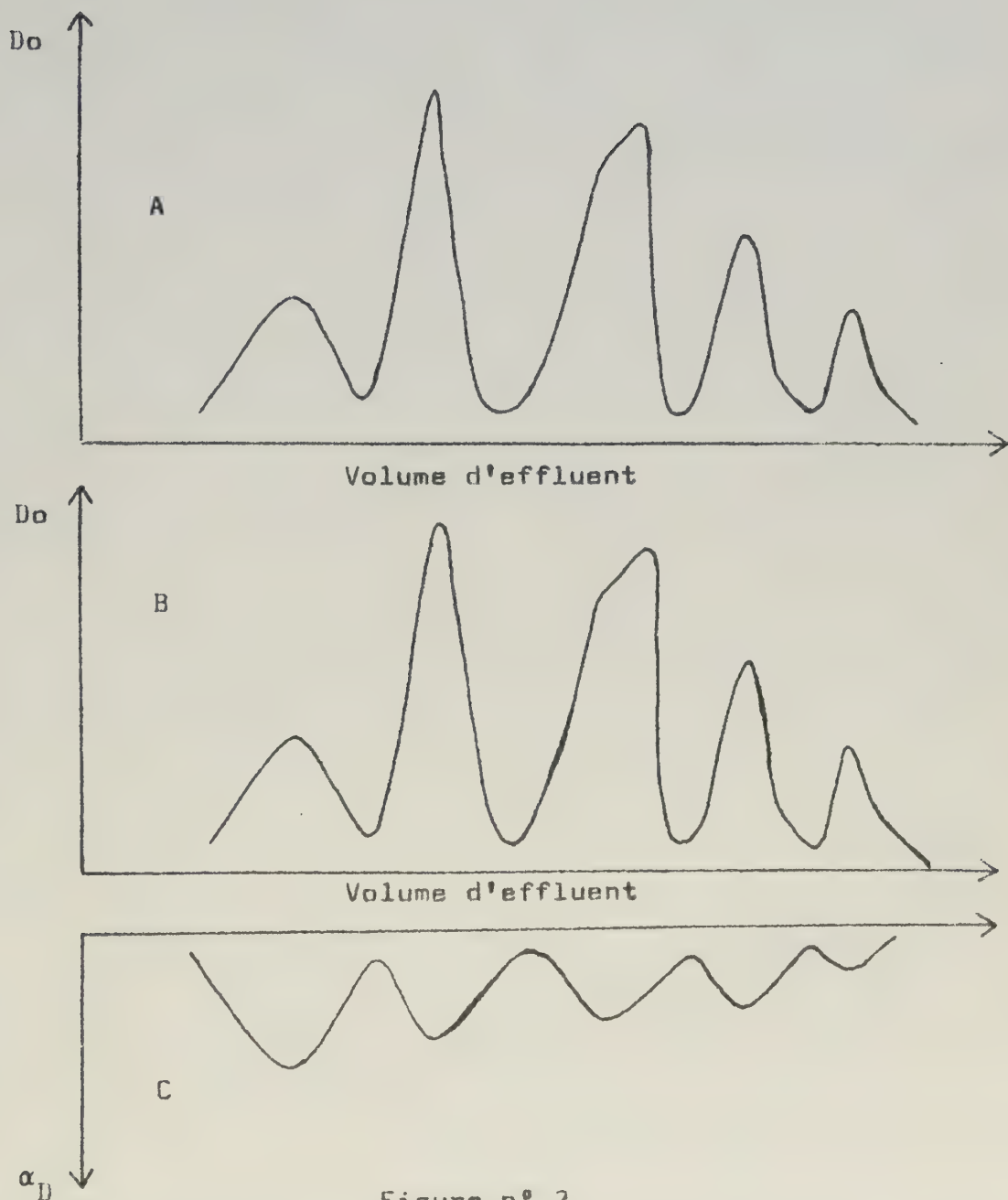


Figure n° 2

Courbe de localisation des produits à la sortie de la colonne

- | | | |
|-----|--------------------------------|-------------------------------|
| A - | Elution par un solvant acide - | Réaction à l'anthrone |
| B - | " " " " | neutre- Réaction à l'anthrone |
| C - | " " " " | " - Déviation polarimétrique |

réaction à l'anthrone et C tracée par enregistrement de la déviation polarimétrique, sont en bonne concordance. Ces deux courbes sont obtenues par élution avec un solvant neutre. Elles sont très semblables à la courbe A, obtenue par élution avec un solvant contenant de l'acide formique.

f) Récupération des oligomannosides réduits dans les éluats.

A Quand l'élution est faite avec des solvants neutres, il suffit de réunir les effluents correspondant à chaque pic de la courbe et de les évaporer sous pression réduite.

B Quand l'élution est effectuée avec des solvants contenant de l'acide formique, il faut éliminer celui-ci qui constitue une impureté et qui en plus risque d'entraîner l'hydrolyse des oligomannosides réduits lors de la concentration.

Le meilleur procédé consiste à faire passer les éluats acides à travers une colonne anionique forte. Nous avons employé l'Amberlite IRA 400, dans la proportion de 1 millilitre de résine pour 100 ml de solution acide 0,01 N.

g) Obtention des oligomannosides réduits purs.

Si l'on chromatographie sur papier les différents oligomannosides réduits, on constate que chaque (mannosyl)_n mannitol est légèrement souillé par le composé élué immédiatement avant. L'examen des courbes d'élution pouvait le laisser prévoir, car entre les différents pics, la courbe ne revient

pas à la ligne de base.

La purification des fractions est achevée :

- 1) pour le mannotriitol par cristallisation par ébullition à reflux avec de l'alcool à 95°.
- 2) pour le mannobiitol, mannotétraïtol, mannopentaïtol, par chromatographie préparative avec le solvant IA (page 17). Ils sont obtenus à l'état de poudre, par évaporation de l'eau sous pression réduite et par plusieurs reprises par l'alcool absolu, suivies de distillation.

C - ETUDE ANALYTIQUE DES OLIGOMANNOSIDES REDUITS.

1) Caractères physiques.

Ils furent déterminés uniquement pour le β mannotriitol, le seul corps cristallisé de la série; les valeurs obtenues sont les suivantes :

- $F = 206^\circ$ non corrigé (tube capillaire)

- Il cristalliserait avec 1 molécule d'eau. Pour la formule $C_{18}H_{34}O_{16}, H_2O$

C calculé % = 41,21 H calculé % = 6,91

C trouvé % = 41,22 H trouvé % = 6,97

$[\alpha]_D^{25} = -24,75^\circ$

Pour les autres composés de la série, obtenus à l'état amorphe, on ne peut déterminer la valeur d' α_D , mais celui-ci négatif pour tous les corps de la série, tenterait à prouver que ceux-ci présentent des liaisons osidiques β .

- Le spectre infra-rouge de ces composés montre la

bande caractéristique des liaisons β mannopyranosyl située à 885 cm^{-1} . Ceci aussi est en faveur d'une configuration β .

2) Migration chromatographique.

1) Après migration de 48 heures, en technique descendante, sur papier Schleicher et Schull b Mgl 2043, avec le solvant IA (page 17), nous obtenons les valeurs suivantes :

<u>R Mannitol</u>		<u>R Mannose</u>	
mannobiitol.....	0,59	mannobiose.....	0,55
mannotriitol.....	0,25	mannotriose.....	0,24
mannotétraitol.....	0,06	mannotétraoise.....	0,06

2) D'autre part, pour la série des oligomannosides réduits, nous obtenons les R_f par chromatographie ascendante, et à l'aide de plusieurs développements. Si nous portons en abscisse le nombre d'unités d'anhydrohexoses contenues dans chacun des trois corps et en ordonnée les valeurs logarithmiques d' α' (α' étant égal à $\frac{R_f}{1-R_f}$, selon la formule de FRENCH et WILD (41)), nous obtenons une droite. Ceci montre que ces corps font partie d'une série d'oligosaccharides homologues où les restes successifs d'unités mannose sont reliés de façon identique.

3) Détermination des résidus mannopyranosyl par la réaction à l'anthrone.

Les résultats sont de 46,4% de résidus mannopyranosyl pour le β mannobiitol (théorie = 50%) et de 69,1% pour le β mannotriitol (théorie = 66,6%).

4) Etude de l'oxydation periodique.

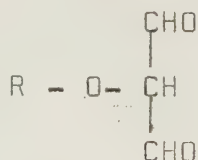
Elle fut exécutée dans les conditions exposées p. 22.

Nous avons effectué l'oxydation periodique du β manno-biitol bien que celui-ci n'ait été obtenu qu'amorphe et du β mannotriitol cristallisé, comparativement à leurs homologues réducteurs, le β mannobiose et le β mannotriose.

La figure n° 3 indique les quantités théoriques d'acide periodique consommé, d'acide monovalent et d'aldéhyde formique libérés par chacun des corps.

Acide periodique consommé

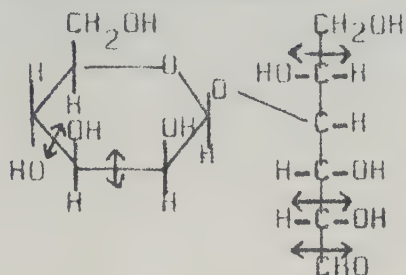
On sait que l'oxydation periodique des oligosaccharides reliés en (1→4) et (1→3) est complexe. La coupure des liaisons glycol α et des liaisons CHOH-CHO conduit à un dérivé du dialdéhyde malonique de la forme :



Ce composé porte un hydrogène actif et il est lentement attaqué par l'acide periodique; cette superoxydation (37) se poursuit jusqu'à séparation de tous les atomes de carbone : un disaccharide lié en 1→4, comme le lactose ou le maltose, consomme au total 11 molécules d'acide periodique, libère 9 HCOOH , 2 HCHO et 1 CO_2 (28). La conséquence est que la courbe représentant la cinétique de l'oxydation présente une pente continue sans palier.

C'est ce que nous avons observé avec les β (1→4)

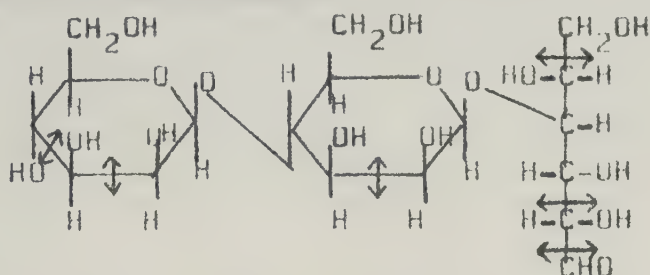
β (1-4) Mannobiose



Théorie

PI : 5 moles
Ac : 3 "
HCHO : 1 "

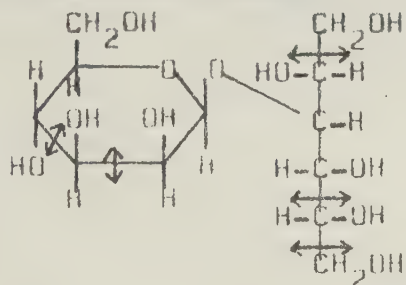
β (1-4) Mannotriose



Théorie

PI : 6 moles
Ac : 3 "
HCHO : 1 "

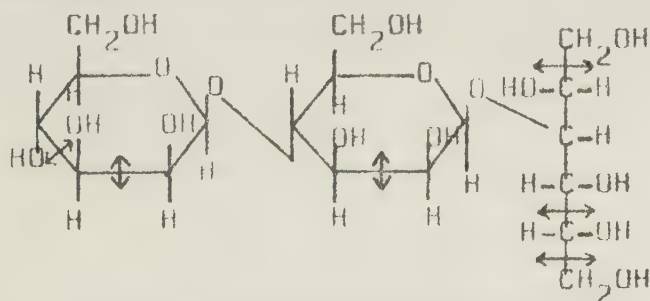
β (1-4) Mannobiitol



Théorie

PI : 5 moles
Ac : 2 "
HCHO : 2 "

β (1-4) Mannotriitol



Théorie

PI : 6 moles
Ac : 2 "
HCHO : 2 "

Figure n° 3

Schéma de l'oxydation periodique des oligomannosides et oligomannosides réduits; les chiffres théoriques indiqués ne tiennent pas compte de la superoxydation

oligomannosides et les β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides réduits (figure n° 4). Après une consommation assez rapide de l'acide periodique dans les premières 24 h., celle-ci se poursuit plus lentement, mais de façon continue.

Acidité apparue.

Comme nous l'avons vu pour la consommation d'acide periodique, la courbe représentant le nombre de molécules d'acide monovalent apparu (qu'on peut en première approximation, considérer comme étant de l'acide formique), présente une partie ascendante continue, aussi bien pour les oligosaccharides réducteurs que non réducteurs (figure n° 5).

Aldéhyde formique libéré.

La figure n° 6 indique le nombre de molécules d'aldéhyde formique libéré, au cours de l'oxydation periodique. La quantité théorique est atteinte plus rapidement pour les oligosaccharides réduits que pour les corps réducteurs.

Ces divers résultats montrent bien que l'oxydation periodique suit le processus habituel chez les oligosaccharides à liaison 1 $\rightarrow$ 4. Le mannobitol étudié étant amorphe, on ne peut tenir compte de façon trop rigoureuse des chiffres obtenus, mais l'allure générale de la courbe est bien superposable à celle obtenue pour le dérivé cristallisé. L'examen de ces courbes appelle quelques commentaires : le ralentissement de l'oxydation periodique, lorsque le nombre de restes manno-pyranosyl augmente mérite d'être signalé : COURTOIS et LE DIZET

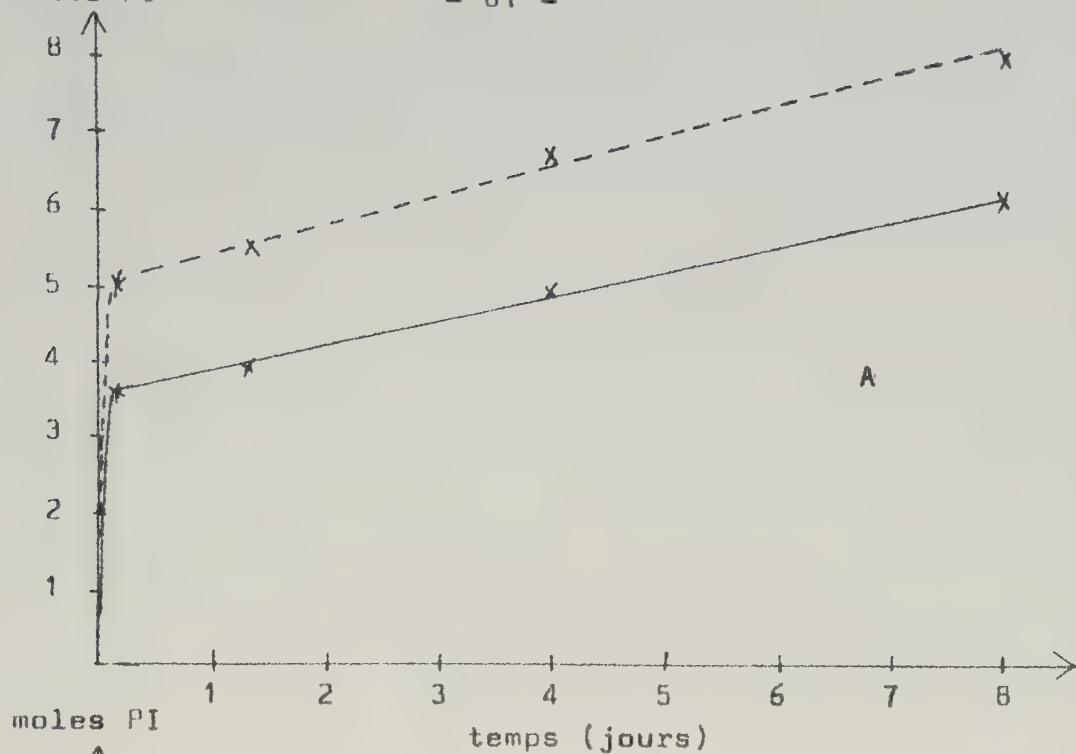
l'avaient déjà remarqué pour les oligomannosides (22) et ce phénomène semble encore plus accentué pour les oligomannosides réduits; il est manifeste pendant tout le processus de l'oxydation. Le ralentissement est reflété également par la courbe de l'acidité apparue. Il serait intéressant de comparer les vitesses d'oxydation d'oligosaccharides dans des séries diverses, de façon à vérifier si ce phénomène de ralentissement est spécifique des restes mannopyranosyl.

D - HYDROLYSE DES OLIGOMANNOSIDES REDUITS, COMPARATIVEMENT A LEURS HOMOLOGUES REDUCTEURS PAR LA β MANNANASE DE FENUGREC.

Les résultats seront exposés dans le chapitre " β mannanase du Fenugrec".

moles PI

- 61 -



moles PI

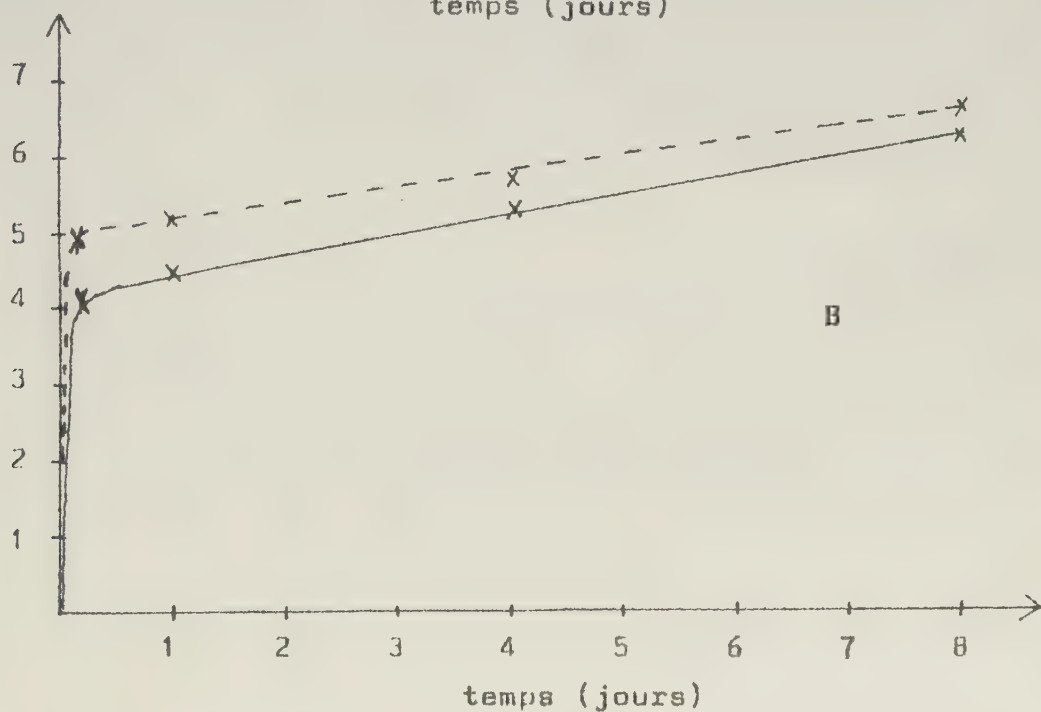


Figure n° 4

Quantité d'acide periodique consommé (PI = Ac.periodique)

A : par les disaccharides

B : par les trisaccharides

— réducteurs

- - - non réducteurs

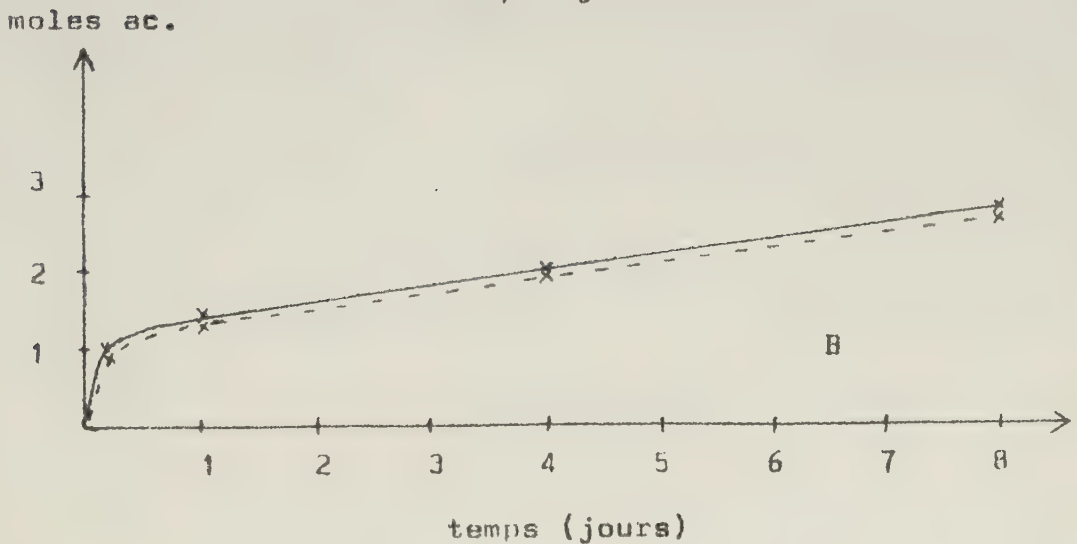
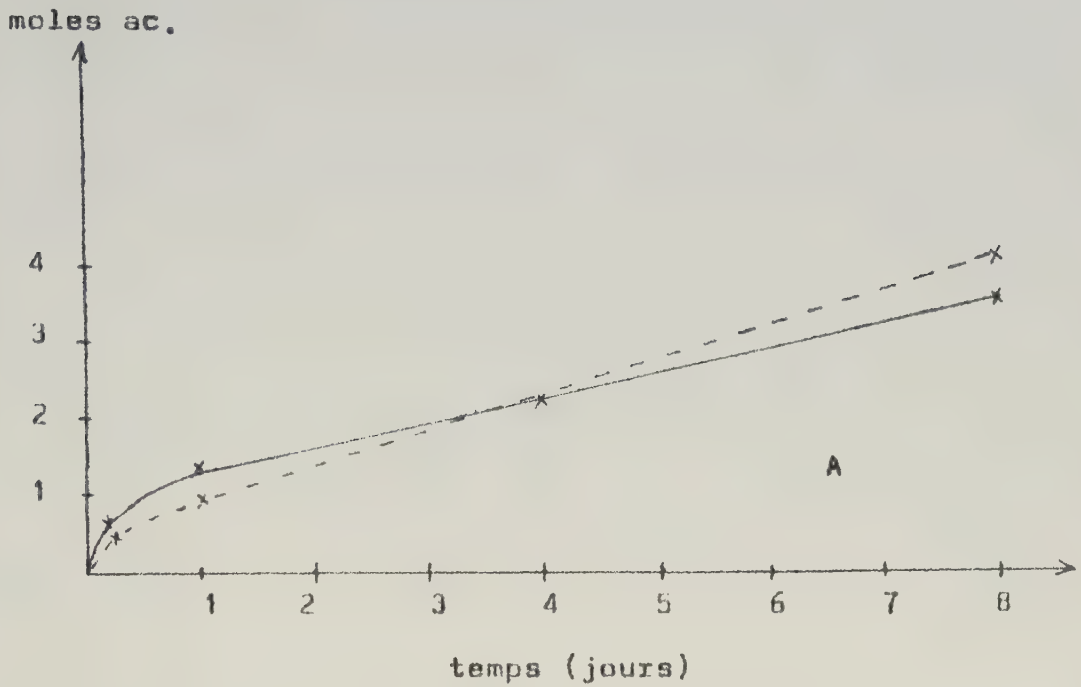


Figure n° 5

Quantité d'acide monovalent libéré (ac. = acide monovalent)

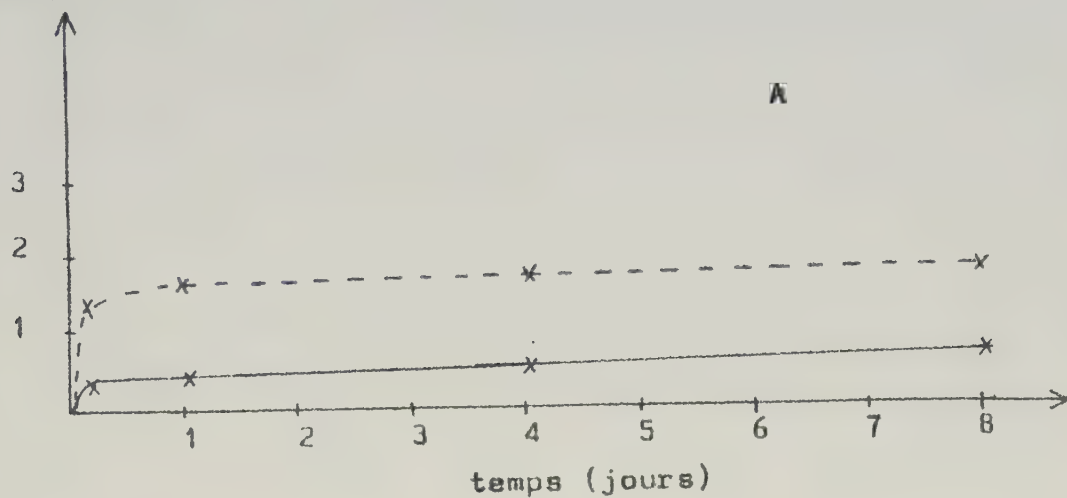
A : par les disaccharides

B : par les trisaccharides

— réducteurs

- - - non réducteurs

moles HCHO



moles HCHO

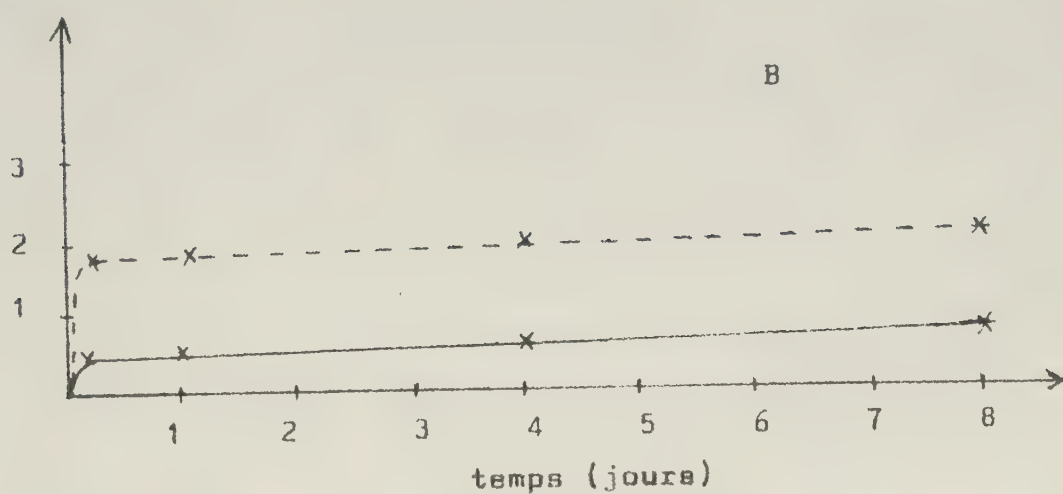


Figure n° 6

Quantité d'aldéhyde formique libéré

A : par les disaccharides

B : par les trisaccharides

— réducteurs

- - - non réducteurs

T R O I S I E M E P A R T I E

ETUDE DE LA β MANNANASE DES GRAINES GERMEES DE FENUGREC.

SON MODE D'ACTION.

-ooOoo-

COURTOIS et PERCHERON (23) étudièrent l' α galactosidase des semences germées de Fenugrec (Trigonella foenum graecum, Légumineuses, L.). Ils constatèrent alors que l'extrait enzymatique de Fenugrec hydrolysait la galactomannane de Fenugrec en libérant non seulement du galactose, mais un disaccharide. Les galactomannanes étant constituées, comme on le sait, par une chaîne centrale d'unités β -D-mannopyranosyl liées en (1 $\rightarrow$ 4), portant des ramifications constituées par des résidus α -D-galactopyranosyl reliés en (1 $\rightarrow$ 6) aux unités mannose de la chaîne centrale, l'apparition d'un disaccharide, quel qu'il soit, implique la présence d'une β mannanase dans cette préparation.

Nous avons confirmé la présence de cette β mannanase dans l'extrait enzymatique de Fenugrec, par hydrolyse des β mannanes de corozo ou de Phoenix canariensis (préparation p. 33); nous observons alors la libération d'une série d'oligosaccharides uniquement constitués d'unités mannose, et ayant des Rg identiques au mannobiose, mannotriose, mannotétraose et mannopentaose.

Nos recherches sur cet enzyme comportent :

- l'extraction de la préparation enzymatique brute,
- divers essais de purification de la β mannanase qui se sont révélés peu fructueux,
- l'étude de quelques propriétés,
- et surtout l'étude du mode d'action de cette β mannanase sur divers substrats : β mannanes, β oligomannosides et β oligomannosides réduits, dont la préparation est décrite dans le chapitre précédent.

I - EXTRACTION DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE DE FENUGREC.

Celle-ci comprend les stades successifs suivants :

- lavage de 300 g de semences de Fenugrec pendant 15 minutes, dans une solution d'acide sulfurique à 10%, puis rinçage à l'eau, jusqu'à neutralité des eaux de lavage.
- immersion des graines dans l'eau distillée pendant 24 heures.
- germination des graines, pendant 48 heures, sur des nappes de coton hydrophile dans des plateaux recouverts d'une plaque de verre et maintenus à 18° - 20°.
- broyage, à l'aide d'un mélangeur électrique, des graines germées, dans une solution de chlorure de sodium à 9%. Agitation mécanique de cette suspension, durant une nuit.
- après filtration sur gaze des débris de graines, dialyse de la suspension, ce qui élimine les sels, les matières colorantes et les oligosaccharides éventuellement présents.
- obtention d'une solution limpide après centrifugation.
- précipitation des protéines enzymatiques par $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ à 80% de saturation (560 g de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ par litre de solution protéique).
- récolte du culot protéique par centrifugation à 20.000 tours/mn. Redissolution des protéines dans 300 ml d'eau distillée.
- dialyse jusqu'à disparition des ions sulfate.
- nouvelle centrifugation qui élimine un faible précipité de protéines.
- conservation de la préparation enzymatique au congélateur à -2

II - ESSAIS DE PURIFICATION DE LA β MANNANASE.

La β mannanase est accompagnée dans la préparation enzymatique de Fenugrec, d' α mannosidase sur laquelle portent aussi nos recherches, de β galactosidase, α galactosidase, α glucosidase, invertase, tréhalase.

Divers essais de purification furent tentés. Ils ne donnèrent pas toujours de résultats très concluants.

- 1) Par chromatographie sur colonne de Sephadex 6.200, avec élution par un tampon acide citrique 0,05 M, phosphate disodique 0,1 M, une grande partie de la β mannanase est élue en même temps que les autres osidases, puis l'éluat renferme une quantité plus faible de la β mannanase, toujours accompagnée de l' α galactosidase, mais exempte des autres osidases.
- 2) Par précipitations fractionnées par le sulfate d'ammonium, une fraction obtenue entre 70% et 90% de saturation en sulfate d'ammonium, conduit à une β mannanase presque dépourvue d' α galactosidase, mais avec une trop grande perte d'activité.
- 3) Par électrophorèse en débit continu, avec l'appareil BECKMAN SPINCO, par élution avec un tampon véronal-véronal sodique, pH 8,6, force ionique 0,02, la β mannanase accompagnée, entre autres, de l' α galactosidase n'est pas obtenue pure, mais on élue une partie de l' α galactosidase privée de la β mannanase.

III - ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DE LA β MANNANASE.

Pour ces expériences, nous employons comme substrat de cette polysaccharidase, les β mannanes de Phoenix canariensis ou de corozo. Mais ces β mannanes présentent l'inconvénient d'être insolubles, ce qui est fort gênant pour l'étude des propriétés de l'enzyme (K_m en particulier...), et ce qui entraîne un pourcentage d'erreur assez important dans les dosages.

1) pH optimum

Celui-ci, difficile à déterminer à cause de l'insolubilité des β mannanes, est environ 5,3 avec un tampon acide citrique 0,1 M, phosphate disodique 0,2 M.

2) Courbe de l'activité par rapport à la concentration en substrat.

Si nous hydrolysons des doses de β mannane de Phoenix canariensis de 10, 20, 30, 40, 50 mg/10 ml de milieu enzymatique, à 37°, pendant 4 heures, nous observons l'amorce d'un palier à partir de 40 - 50 mg. Cette courbe n'a qu'une valeur très relative, car le temps d'hydrolyse est long et le substrat étant insoluble, on ne peut envisager une détermination convenable du K_m dans ces conditions.

IV - MODE D'ACTION DE LA β MANNANASE.

1) Principe.

Devant la difficulté de la purification de la β

mannanase, nous étudions la spécificité d'action de celle-ci sur des substrats contenant exclusivement des groupes manno-pyranosyl. Il est alors possible d'utiliser la préparation enzymatique totale, car celle-ci ne contient pas de β mannosidase (absence d'hydrolyse du phényl β -D-mannoside et du β mannobiose), qui serait capable de scinder les substrats que nous employons; les autres enzymes qui accompagnent la β mannanase (α galactosidase, α mannosidase...) n'ont aucune action sur ceux-ci.

2) Techniques expérimentales et résultats.

Les réactions d'hydrolyse sont conduites dans les conditions suivantes :

- substrat (oligomannosides ou oligomannosides réduits) 0,5 ml en solution 0,025 M
- tampon acide citrique 0,1 M, phosphate..... 0,125ml disodique 0,2 M (pH = 5,3)
- préparation enzymatique..... 0,125ml
- eau distillée..... 0,5 ml

Les mannanes étant insolubles dans les conditions d'expérience, nous utilisons une quantité de 5 mg de ces substrats, pour un volume total de 1,25 ml, dans les mêmes conditions.

Les réactions sont effectuées à 37°, et l'hydrolyse est suivie au bout de 30, 60, 90 mn, puis 2,3,4,24 et 48 h. par chromatographie du milieu réactionnel sur papier Arches 304, avec le solvant I A. Les oses et oligosides réducteurs

sont révélés par les réactifs à l' α -phénylène diamine (31) ou à la β naphtylamine (76). Les réactifs au nitrate d'argent en milieu alcalin (84) ou au tétracétate de plomb (10) sont utilisés pour la révélation des oligosides non réducteurs aussi bien que des oligosides réducteurs.

L'hydrolyse des mannanes de corozo ou de Phoenix canariensis conduit à une série d'oligomannosides (mannotétraose, mannotriose, mannobiose) accompagnés seulement de traces de mannose. Ce résultat est confirmé par le fait que ni le mannobiose, ni le mannotriose purs ne sont attaqués par l'enzyme.

Le mannotétraose est scindé en mannobiose, accompagné de mannotriose et de traces de mannose.

Le mannopentaose est hydrolysé en mannobiose, mannotriose avec apparition de traces de mannose.

Les oligomannosides réduits sont attaqués plus difficilement, puisque les mannobiitol, mannotriitol et mannotétraitol ne sont pas hydrolysés. La β mannanase n'hydrolyse cette série qu'à partir du mannopentaitol. La chromatographie sur papier en solvant I A montre, dans le produit d'hydrolyse, la présence de deux composés révélables à l' α -phénylène diamine (donc réducteurs) et de R_f identiques à ceux du mannobiose et du mannotriose, mais le mannobiitol et le mannotriitol ont respectivement la même migration chromatographique que leurs homologues réducteurs et peuvent donc les accompagner sans qu'on puisse les mettre en évidence. Les essais de séparation des couples mannobiose-mannobiitol et mannotriose-mannotriitol

par chromatographie sur papier avec d'autres solvants, par chromatographie en couche mince sur Chromagram Kodak, et par électrophorèse sous haute tension furent infructueux. Au contraire, la chromatographie sur couche mince de Kieselgel G, avec les solvants I B et II B (page 21) de l'éluat des bandes correspondant au mannobiose et au mannotriose sur chromatogrammes sur papier conduit, en effectuant un double développement, à une très bonne séparation de ces composés (figure n° 7).

Nous observons alors deux taches intenses ayant le même R_g que le mannobiose et le mannotriitol, et deux taches beaucoup plus faibles ayant le même R_g que le mannotriose et le mannobiitol (tableau n° V). La liaison 3 du mannopentaïtol subirait donc une attaque plus importante que la liaison 2.

L'ensemble des corps libérés par hydrolyse des différents substrats est reporté dans le tableau n° IV.

3) Discussion.

A l'aide de nos résultats expérimentaux, il nous est possible de formuler quelques hypothèses sur le mode d'attaque des chaînes de β (1→4) oligomannosides et de β (1→4) oligomannosides réduits par la β mannanase de Fenugrec.

Le tableau n° V donne un schéma des points hypothétiques d'hydrolyse déduits de nos expériences.

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par REESE et SHIBATA (77) avec quelques mannanases fongiques. Ces auteurs étudièrent, par chromatographie, particulièrement, la

Produits libérés par hydrolyse des différents substrats.

<u>Corps réducteurs</u>	<u>Produits libérés</u>	<u>Homoloques réduits</u>	<u>Produits libérés</u>
$\beta(1\rightarrow4)$ mannobiose	0	$\beta(1\rightarrow4)$ mannobitol	0
$\beta(1\rightarrow4)$ mannotriose	0	$\beta(1\rightarrow4)$ mannotritol	0
$\beta(1\rightarrow4)$ mannotétrase	mannotriose mannobiose mannose	$\beta(1\rightarrow4)$ mannotétritol	traces
$\beta(1\rightarrow4)$ mannopentaose	mannotriose mannobiose mannose (traces)	$\beta(1\rightarrow4)$ mannopentaitol	mannotritol mannobiose
$\beta(1\rightarrow4)$ mannane de corozo et de <u>Phoenix canariensis</u>	mannotétrase mannotriose mannobiose mannose (traces)	en quantités plus faibles	mannobitol mannotriose

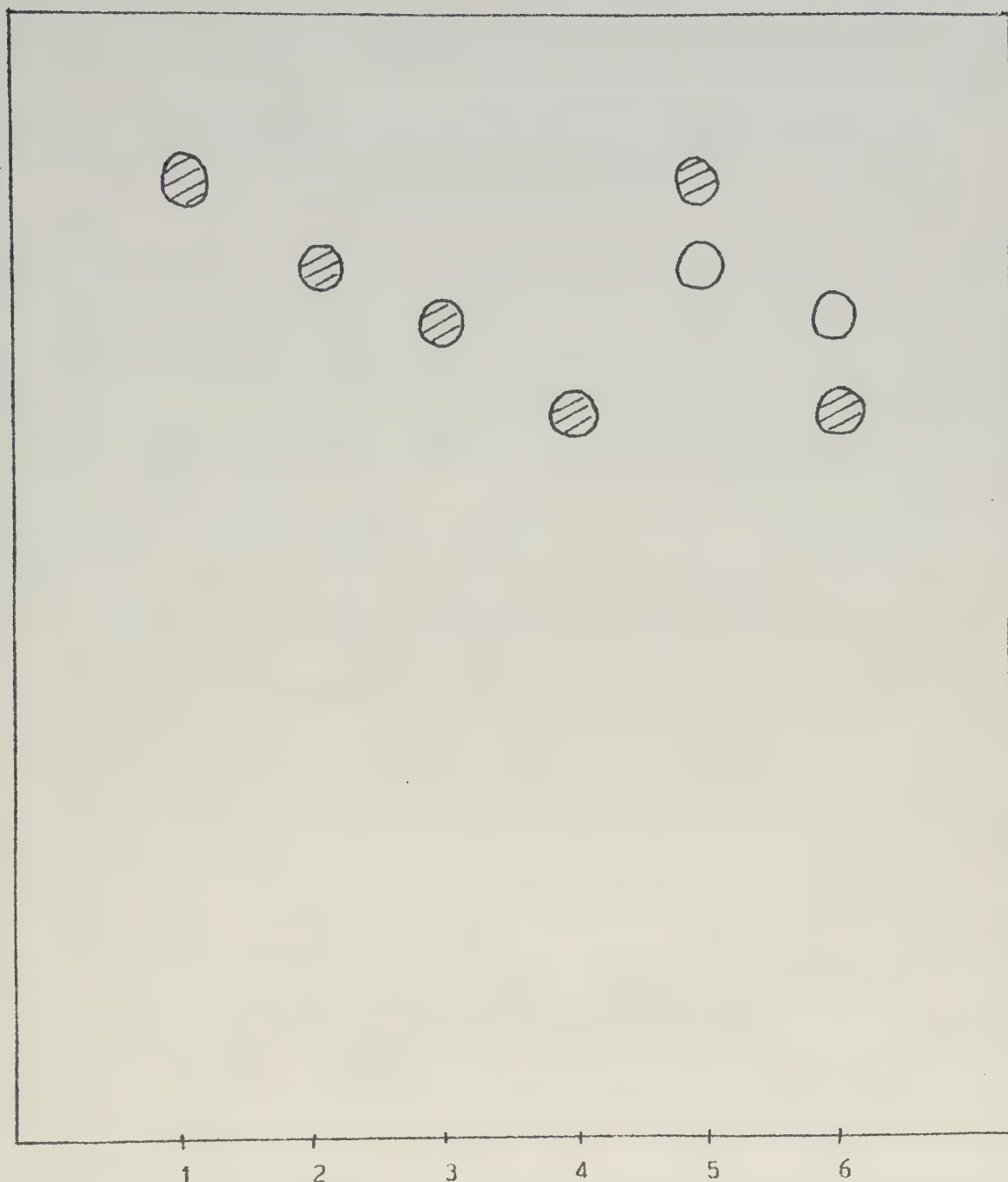


Figure n° 7

Séparation par chromatographie sur couche mince de Kieselgel G des couples mannobiose - mannobitol et mannotriose - mannotriitol obtenus par hydrolyse du β mannopentaïtol par la β mannanase de Fenugrec.

1 : mannobiose 2 : mannobitol 3 : mannotriose 4 : mannotriitol
5 et 6 : éluat des bandes correspondant respectivement au mannobiose et au mannotriose, sur chromatogrammes sur papier.

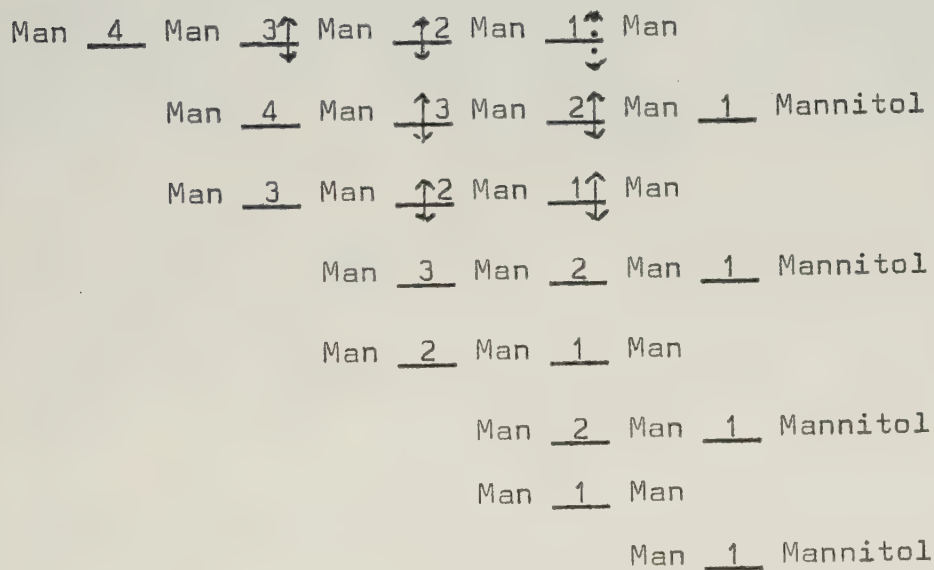
TABLEAU n° V

Schéma du mécanisme de l'hydrolyse des oligomannosides et
oligomannosides réduits.

Les flèches indiquent les points d'attaque présumés :

$\updownarrow$ = point d'attaque

$\updownarrow\updownarrow$ = point d'attaque très faible pouvant survenir.



dégradation de la galactomannane de caroube par la β mannanase de Bacillus subtilis. La persistance du mannobiose et du mannotriose dans l'hydrolysât des β mannanes, ainsi que l'absence d'hydrolyse des mêmes oligosides quand ils sont utilisés comme substrats, suggèrent que l'enzyme ne peut hydrolyser que des substrats comportant au moins quatre résidus β mannopyranosyl.

Nous rejoignons là les conclusions de CLARKE et STONE (11) qui montrèrent que la glucane β (1 $\rightarrow$ 4) hydrolase d'Aspergillus niger n'hydrolyse les β (1 $\rightarrow$ 4) oligoglucosides qu'à partir du tétramère. De plus, la β mannanase, tout comme l'enzyme de CLARKE et STONE, n'attaque le tétraïtol que d'une façon insignifiante (et au bout d'un temps prolongé), alors que le tétraose est hydrolysé rapidement.

Il semble que quatre cycles mannopyranosyl soient indispensables, car le mannitol terminal, qui ne peut prendre la forme cyclique, semble incapable de remplacer une unité mannose du substrat.

Le comportement de cette β mannanase peut être comparé à celui du lysozyme, qui n'agit que sur une chaîne suffisamment longue d'osamines (tétramère, hexamère), cette chaîne se plaçant, pendant l'hydrolyse, dans une sorte de gouttière au sein de la molécule de l'enzyme, ce qui assure la fixation du substrat au niveau du centre actif et permet son hydrolyse.

CLARKE et STONE indiquent que le cellobiose est le "produit principal" d'hydrolyse du cellotétraose, mais ces auteurs ne précisent pas quels sont les autres produits formés. En agissant sur le mannotétraose, la β mannanase de Fenugrec

libère également du mannobiose, mais ce dernier est accompagné de mannotriose et de faibles quantités de mannose. Ces résultats ont été retrouvés sur le mannotétraose que nous avons préparé et sur un échantillon envoyé par M. ASPINALL. La quantité de mannose libéré devrait logiquement être équivalente à celle du mannotriose apparu au cours de l'hydrolyse. Peut être pourrait-on envisager une attaque du mannotétraose en plusieurs temps : tout d'abord, une hydrolyse en deux molécules de mannobiose, puis transfert d'un mannobiose sur un mannotétraose, formant un mannohexaose, qui serait scindé en mannotriose. Nous ne disposons pas d'une quantité suffisante de mannotétraose permettant de vérifier cette hypothèse par l'isolement des composés intermédiaires.

Ces résultats sont en accord avec ceux de COURTOIS et LE DIZET (22), obtenus par action d'une préparation enzymatique de Luzerne sur le mannotétraose.

D'autre part, le fait que l'hydrolyse des oligomannosides réduits ne laisse jamais apparaître de mannose libre, suggère que les traces de mannose apparues au cours de l'hydrolyse des oligosides proviendraient d'une attaque faible à l'extrémité réductrice.

Enfin, l'étude des produits d'hydrolyse du mannopentaïtol permet de situer une attaque principale au niveau de la liaison 3 (tableau n° V), libérant de grosses quantités de mannobiose et de mannotriitol, et une attaque secondaire au niveau de la liaison 2, avec libération de quantités plus faibles de mannotriose et de mannobiitol.

L'ensemble de nos résultats, et tout particulièrement l'absence d'hydrolyse du mannobiose, ainsi que le fait que, tant à partir des mannanes qu'à partir d'oligomannosides, seulement des traces de mannose sont libérées, nous permettent de penser que, la β mannanase de Fenugrec, comme la glucane hydrolase d'Aspergillus niger, se comporte comme une endopoly-saccharidase.

Q U A T R I E M E P A R T I E

ETUDE DE L' α MANNOSIDASE DE FENUGREC

-oo0oo-

Parmi les osidases scindant les substrats à liaison mannopyranosyl, nous trouvons dans la préparation enzymatique de Fenugrec, à côté de la β mannanase, une α mannosidase. Comme nous l'avons déjà signalé, cette α mannosidase est accompagnée en outre d'une α galactosidase, d'une β galactosidase, d'une α glucosidase, d'une tréhalase et d'une β fructosidase.

Avant d'étudier les propriétés de cette α mannosidase il était indispensable de procéder à sa purification.

I. PURIFICATION DE L' α MANNOSIDASE PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION.

L'extrait enzymatique de Fenugrec préparé suivant le procédé décrit p.70 est soumis à la filtration sur gel de Sephadex G 200.

1) Technique.

a) Conditionnement de la colonne.

Le choix du Sephadex G 200 a été dicté par un essai préliminaire de séparation sur Sephadex G 100, qui avait montré que l' α mannosidase était éluee en tête, mais incomplètement séparée des autres enzymes.

Nous utilisons une colonne "Pharmacia"^{*} de 115 cm de hauteur et de 3 cm de diamètre siliconée avec du Rhodorsil hydrofuge 240^{**} pour éviter les effets de bord.

Le Sephadex G 200 est mis à gonfler à + 4°, pendant trois jours, dans l'eau distillée. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, un dernier lavage est effectué avec le tampon qui servira pour l'élution, tampon acide citrique 0,05 M - phosphate disodique 0,1 M de pH 5,30. La colonne est équilibrée, pendant 48 heures, avec ce même tampon.

Nous déposons à la surface de la colonne, à l'aide de l'applicateur afin d'éviter une perturbation du gel, un échantillon de solution enzymatique correspondant à 5 g de graines et contenant 52 mg de protéines.

L'éluat est recueilli par fractions de 5 ml au moyen d'un collecteur.

Toutes les opérations sont conduites à + 4°.

b) Détermination de l'activité enzymatique des différentes fractions.

La courbe d'élution des protéines est obtenue par enregistrement continu de la densité optique de l'éluat à 280 nm, grâce à un spectrophotomètre G.M.E.^{***}

L'activité enzymatique de l' α mannosidase et des osidases qui l'accompagnent dans la préparation brute est déterminée tous les cinq tubes, même dans les portions d'éluat

*

Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Suède)

** Ets Prolabo

*** Gilson Medical Electronics (France)

pauvres en protéines, par hydrolyse des phényl-osides pour la recherche de l' α mannosidase, de l' α galactosidase, de la β galactosidase et de l' α glucosidase, par hydrolyse de la β mannane de Phoenix canariensis, pour celle de la β mannanase, et enfin par hydrolyse du tréhalose et du saccharose pour mettre en évidence la tréhalase et la β fructosidase. La quantité de saccharides réducteurs libérés au cours de ces hydrolyses est dosée par la méthode de NELSON-SOMOGYI (70) (79). Les résultats de ces différentes activités sont reportés sur une courbe (voir plus loin figure n° 8).

c) Récolte de l' α mannosidase.

Les tubes correspondant au pic d' α mannosidase dépourvus des autres osidases sont rassemblés.

La conservation de l' α mannosidase nous a posé quelques problèmes. La lyophilisation dans un tampon acide citrique 0,1 M, phosphate disodique 0,2 M, à pH 4,3 (pH optimum de l' α mannosidase), entraîne une perte d'activité de 75%. D'autre part l' α mannosidase est très sensible à la congélation - décongélation. Au début de notre travail, nous utilisions l'enzyme conservé à + 4°, dans un délai maximum de 72 heures après son élution. Ceci n'était pas très satisfaisant car on observait une diminution d'activité avec le temps, conséquence probable d'une dénaturation. Un nouvel essai de lyophilisation de l' α mannosidase, mais cette fois-ci, dans le tampon d'élution de la colonne (acide citrique 0,05 M, phosphate disodique 0,1 M, pH 5,3) ne décéléra qu'une perte d'activité très minime.

Pour tous les essais enzymatiques, sauf pour la détermination du pH optimum et pour le dosage des protéines où elle est dialysée contre l'eau distillée, la solution enzymatique est donc lyophilisée telle quelle, dans le tampon d'élution, par fractions de 2 ml. Pour les dosages, nous ramenons la solution enzymatique au pH optimum de l'enzyme, par addition d'une solution d'acide citrique - phosphate disodique.

2) Résultats et remarques sur la séparation sur Sephadex G 200.

Sur la courbe d'élution des osidases (figure n° 8), établie comme il est décrit précédemment, nous observons :

- que l' α mannosidase apparaît la première,
- qu'elle est presque dépourvue des autres osidases,
- qu'elle se trouve, fait favorable à sa purification, dans les fractions très pauvres en protéines, dont la majeure partie (enzymatique ou non) est élue ultérieurement. A la seule observation de cette courbe on remarque la masse énorme de protéines éliminées lors de cette expérience.

La purification de l' α mannosidase a été suivie en déterminant l'activité spécifique des préparations sur le p.nitrophényl α -D mannoside; les résultats figurent sur le tableau n° VI (protéines dosées par la méthode de LOWRY (64)).

Nous parvenons donc à un enrichissement de 61 fois par rapport à l'extrait de départ.

Le rendement de la récupération de l' α mannosidase après passage sur Sephadex est de 73%.

La chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex réalise une séparation des protéines en fonction de leur

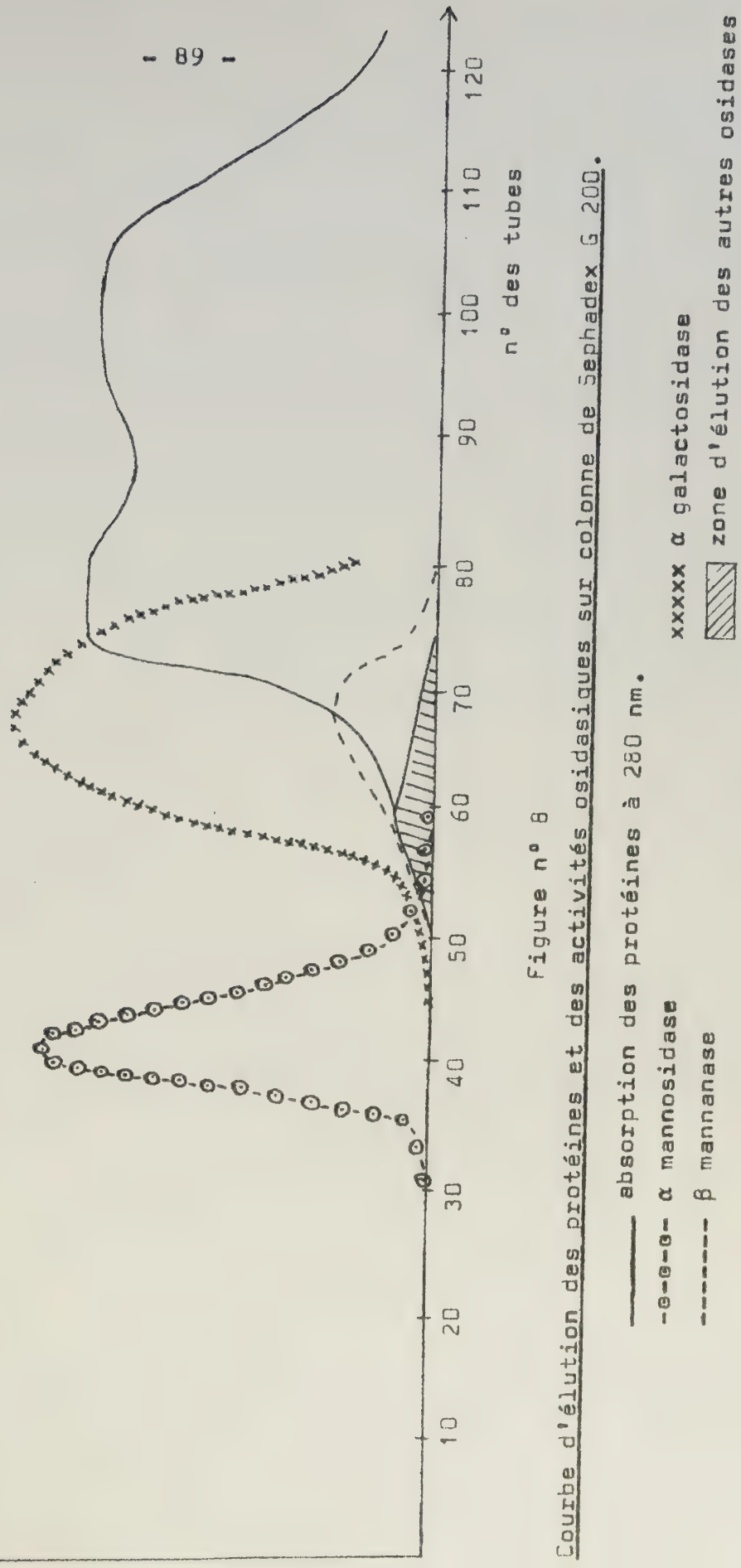


TABLEAU N° VI

Purification de l' α mannosidase : activité exprimée en μ moles
de p-nitrophényl α -D-mannoside hydrolysé par mg de protéine
en une heure à 37°

	Activité spécifique	Facteurs d'enrichissement
extrait enzymatique brut	3,9	0
extrait précipité par le sulfate d'ammonium à 80% de saturation	7,85	2
enzyme élué de la colonne de Sepha- dex 200	238	61

taille moléculaire, les molécules les plus grosses étant éluées les premières; il semble donc que l' α mannosidase ait un poids moléculaire supérieur à celui des osidases qui l'accompagnent. De plus, le volume d'élution de l' α mannosidase (210 ml) étant proche du volume mort de la colonne (176 ml), il est permis de penser que cet enzyme possède un poids moléculaire élevé.

Un essai destiné à vérifier si l'augmentation de la force ionique du tampon d'élution modifierait le comportement de l'enzyme par dissociation éventuelle d'agrégats moléculaires, fut négatif : en utilisant un tampon quatre fois plus concentré, l'ordre d'apparition des osidases dans les éluats fut inchangé, l' α mannosidase apparaissant toujours en tête, après le volume mort de la colonne.

Enfin, signalons que pour obtenir une quantité d'enzyme permettant d'étudier ses propriétés, nous avons dû réaliser successivement la purification sur une quinzaine de colonnes. Le processus d'élution fut parfaitement reproductible au cours de ces expériences. Mais chacune de ces séparations sur colonne est longue, et l'obtention d'une quantité suffisante d' α mannosidase nous a demandé plusieurs mois.

3) Vérification de la pureté de l' α mannosidase.

Nous nous sommes tournée vers des techniques utilisables sur de très faibles quantités de protéines.

a) Electrophorèse en gel de polyacrylamide,^{*} avec l'appareil
Canalco^{**}, selon la technique de DAVIS et ORNSTEIN (30).

Nos conditions opératoires sont les suivantes : le gel contient 7,5% de polyacrylamide dans le tampon tris - HCl, pH 8,6; celui-ci est introduit dans des tubes de 65 mm x 6 mm. Après prise en masse de ce gel, l'échantillon (200Y de protéine provenant de la lyophilisation de 10 ml de solution enzymatique dans un tampon acide citrique 0,00125 M, phosphate disodique 0,0025 M), est mélangé avec un gel de 2% de polyacrylamide à pH 6. Ce mélange est déposé au dessus du gel à 7,5% de polyacrylamide. Durant l'électrophorèse, l'intensité est de 5 microampères par tube, la tension de 150 volts, la durée de l'électrophorèse d'environ 30 minutes.

Après coloration au noir amide, nous observons une bande très intense, accompagnée d'une deuxième très faible. On ne peut à l'oeil apprécier avec précision les proportions relatives de ces deux bandes, cependant on peut estimer approximativement que l'intensité de la deuxième bande est au moins 20 à 30 fois plus faible. Puisque la courbe d'élution sur Sephadex révèle un pic d'activité osidasique très aigu dans une zone où la quantité de protéines est très faible, il y a de fortes chances pour que la bande intense observée après électrophorèse corresponde à l' α mannosidase. Elle serait alors accompagnée d'une impureté protéique en proportion peu

* Nous remercions Monsieur P. LALEGERIE, grâce à qui nous avons pu pratiquer les expériences d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

** Ets Jarre et Jacquin, 26, rue Pierre Curie, PARIS V°.

importante.

b) Etude immunologique.

Un immunosérum fut préparé par inoculations répétées, au Lapin, de l'extrait enzymatique obtenu par précipitation avec le sulfate d'ammonium. Grâce à ce sérum nous avons pu étudier la pureté de l' α mannosidase par deux techniques :

α) la technique d'OUCHTERLONY (73)* : dans la zone de diffusion correspondant à l'extrait enzymatique, on peut repérer trois arcs de précipitation, alors qu'un seul arc est visible dans la zone de diffusion de l' α mannosidase purifiée.

β) l'immunoélectrophorèse (43) : grâce à la meilleure résolution de cette technique, on peut mettre en évidence une huitaine d'arcs de précipitation après électrophorèse de l'extrait enzymatique, alors qu'un seul arc est visible par électrophorèse de l' α mannosidase purifiée.

Nous n'avons pu allier à ces techniques l'ultracentrifugation, car les concentrations en protéine enzymatique que nous avons pu obtenir restent insuffisantes. Ces expériences ont été réalisées sur de faibles quantités d'enzyme purifié, mais ces résultats, s'ajoutant à celui de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, sont en faveur d'un degré de puri-

* La réaction d'OUCHTERLONY et l'immunoélectrophorèse ont été effectuées dans le laboratoire du Professeur M. SELIGMANN, à l'Hôpital St-Louis, grâce à Monsieur D. HUREZ et Monsieur M. BOULARD, à qui nous adressons nos très vifs remerciements.

fication assez avancé de cette α mannosidase.

II. ETUDE DES PROPRIETES DE L' α MANNOSIDASE.

Afin d'étudier les propriétés de cette α mannosidase, nous avons employé comme substrat, pour les premiers essais le phényl α -D-mannoside, avec dosage du mannose libéré par la méthode de NELSON-SOMOGYI. Nous avons préféré par la suite utiliser le p.nitrophényl α -D-mannoside préconisé par CONCHIE (12) : ce substrat est hydrolysé plus rapidement par l'enzyme et le dosage du p.nitrophénol libéré est particulièrement aisé. Le p.nitrophényl α -D mannoside est préparé suivant la technique de JERMYN (54).

1) Détermination de l'activité enzymatique.

Les conditions sont les suivantes :

- p.nitrophényl α -D-mannoside 0,025 M	1,5 ml
- enzyme dans tampon pH 4,30	0,25 ml
{ acide citrique 0,1 M phosphate disodique 0,2 M	
- eau	0,25 ml

Au bout de 30 minutes d'hydrolyse, nous ajoutons dans chaque tube 2 ml de tampon glycine-NaOH 0,4 M (pH 10,8). La lecture de la coloration jaune ainsi développée est faite à 430 nm, par comparaison avec une gamme de p.nitrophénol.

2) Détermination du pH optimum (figure n° 9).

La gamme de tampons essayée (tampon de MAC ILVAINE,

acide citrique 0,1 M - phosphate disodique 0,2 M) s'étend de pH 2 à pH 6,8, de 0,4 en 0,4 unité pH en dessous de pH 4 et au dessus de pH 6, et de 0,2 en 0,2 unité pH, de pH 4 à 6. Nous vérifions, sur des parties aliquotes, le pH du milieu enzymatique au temps zéro et en fin d'hydrolyse. Pour la détermination du pH optimum sur le phényl α -D-mannoside, le dosage du mannose par la méthode de NELSON-SOMOGYI, nécessitant un milieu alcalin, nous ajoutons pour une prise d'essai de 1 ml d'hydrolysate enzymatique 0,2 ml de NaOH N dans chacun des tubes de pH inférieur à 4 et 0,1 ml de NaOH N dans les tubes de pH 4 à 7.

Dans un premier temps, le pH optimum a été déterminé avec les deux substrats phényl α -D-mannoside et nitrophényl α -D-mannoside, à des concentrations arbitraires, respectivement 10 mM et 2 mM par litre. Avec le phényl α -D-mannoside, l'hydrolyse maximale a été obtenue avec un tampon de pH 4,78, le pH du milieu réactionnel étant alors 5,03. Avec le nitrophényl α -D-mannoside, elle est observée avec un tampon de pH 4,30, le pH du milieu réactionnel étant alors 4,50. Il n'y a pas de changement de pH de ce milieu entre le temps zéro et la fin d'hydrolyse.

Pour le nitrophényl α -D-mannoside, un essai fait avec une concentration approchant de la concentration saturante (cette dernière ne pouvant être atteinte à cause de la faible solubilité du substrat), nous a donné le même pH optimum.

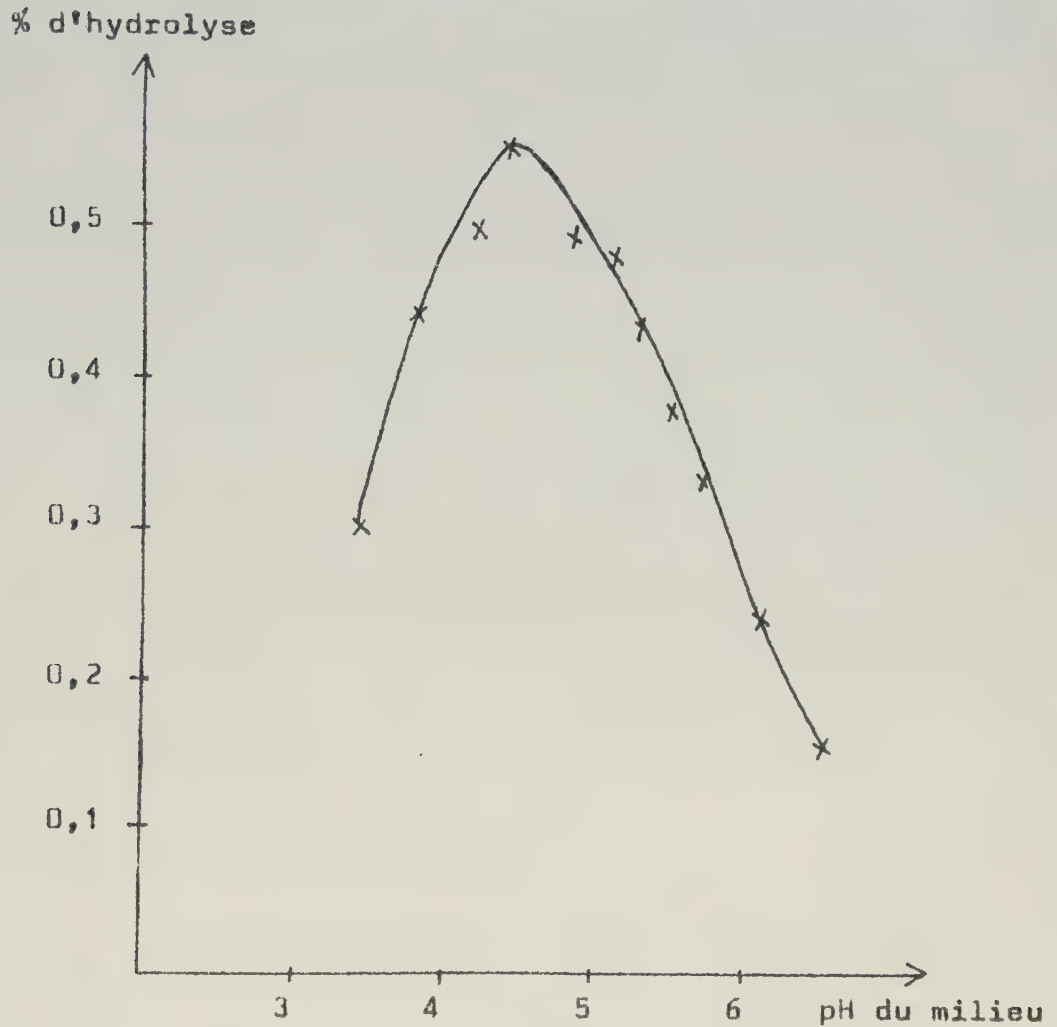


Figure n° 9

Influence du pH du milieu sur l'activité de l' α mannosidase
de Fenuqrac

Substrat : p.nitrophényl α -D-mannoside

tampon MAC ILVAINE : acide citrique 0,1 M

phosphate disodique 0,2 M

3) Constante de MICHAELIS (K_m).

Nous avons déterminé la vitesse d'hydrolyse du p.nitro-phényl α -D-mannoside, pour des concentrations de ce substrat étalées de 0,19 mM à 18,7 mM dans le milieu réactionnel, et pour une durée d'incubation de 30 mn à 37°. La représentation graphique des résultats selon LINEWEAVER et BURK (62) permet de déterminer un $K_m = 2,5$ mM.

La solubilité du substrat ne nous a pas permis de dépasser une concentration de 18,7 mM dans le milieu de réaction. D'après la courbe $v = f(s)$, cette concentration ne correspond pas au palier de la vitesse. Elle représente toutefois 7,5 fois le K_m de l'enzyme, et n'est pas très éloignée de la concentration saturante pour cet enzyme. C'est cette concentration qui a été retenue pour tous les autres essais.

4) Cinétique de la réaction (figure n° 10).

Nous avons pu vérifier que l'activité α mannosidasique est proportionnelle au temps, pendant au moins 7 heures. Pour la détermination du K_m que nous effectuons au bout de 30 mn, nous nous trouvons donc bien dans un laps de temps correspondant à la vitesse initiale.

D'autre part, le plateau atteint seulement au bout d'un temps très long, ne correspond pas à l'utilisation totale du substrat (8,8 mM sur 18,7 mM). Si on ajoute alors de l'enzyme, l'hydrolyse démarre à nouveau. Ceci tendrait à prouver que l'arrêt de la réaction était dû à la dénaturation de l'enzyme pendant cette expérience de longue durée, et non à

une inhibition par les produits libérés au cours de l'hydrolyse.

5) Inactivation par la chaleur (figure n° 11).

Des essais d'inactivation de l' α mannosidase à 45°, en fonction du temps, ont été réalisés. Le protocole est le suivant : des tubes contenant 0,5 ml de solution enzymatique tamponnée à pH 4,50, sont maintenus au bain-marie à 45° pendant respectivement 15, 30, 45, 60 mn. Ils sont ensuite plongés dans la glace fondante, et on ajoute dans chacun des tubes 1,5 ml de substrat 0,025M. Après incubation 30 mn à 37°, l'activité enzymatique est déterminée comme indiqué précédemment. La figure n° 11 montre que la courbe log activité en fonction du temps est une droite. Une telle courbe, représentant une loi du premier ordre pour l'inactivation thermique de l' α mannosidase, laisse penser qu'une seule espèce enzymatique a participé à l'hydrolyse du substrat, la présence de plusieurs isoenzymes donnant une droite à plusieurs pentes.

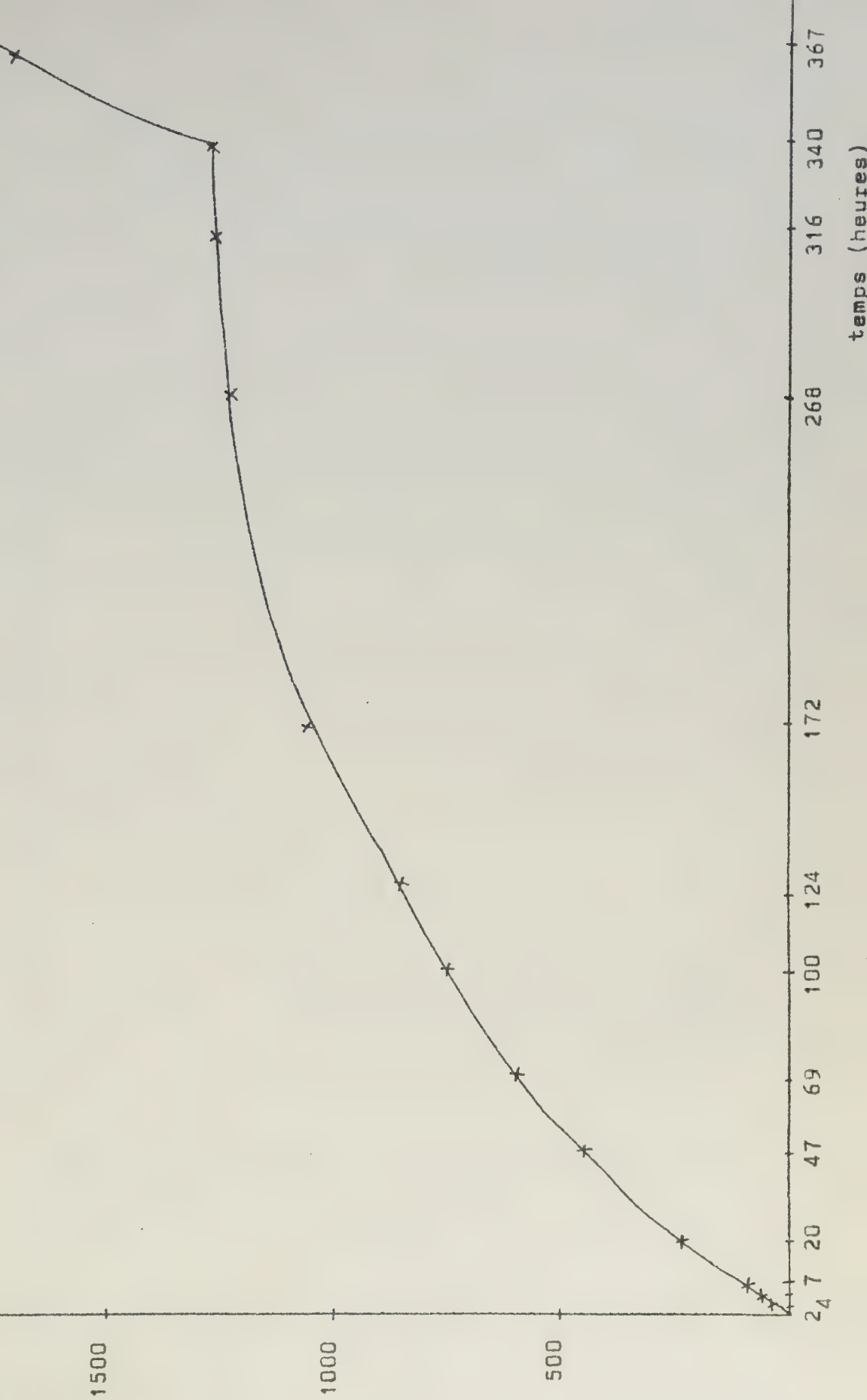
Bien que des essais spéciaux n'aient pas été effectués, on peut penser d'après les résultats de la cinétique et de l'inactivation par la chaleur qu'il y a protection par le substrat. En effet, pour l'expérience de la cinétique où l'enzyme est en présence de substrat, l'activité α mannosidase est proportionnelle au temps c'est à dire que l'enzyme ne subit pas d'inactivation pendant 7 heures; au contraire, lors d'un essai d'inactivation où l'enzyme est chauffé à 37°, uniquement en présence de tampon, en une heure par exemple on

γ NO₂ phénol/ml

Figure n° 10

Cinétique de la réaction d'hydrolyse de l' α mannosidase

substrat : p.nitrophényl α -D-mannoside



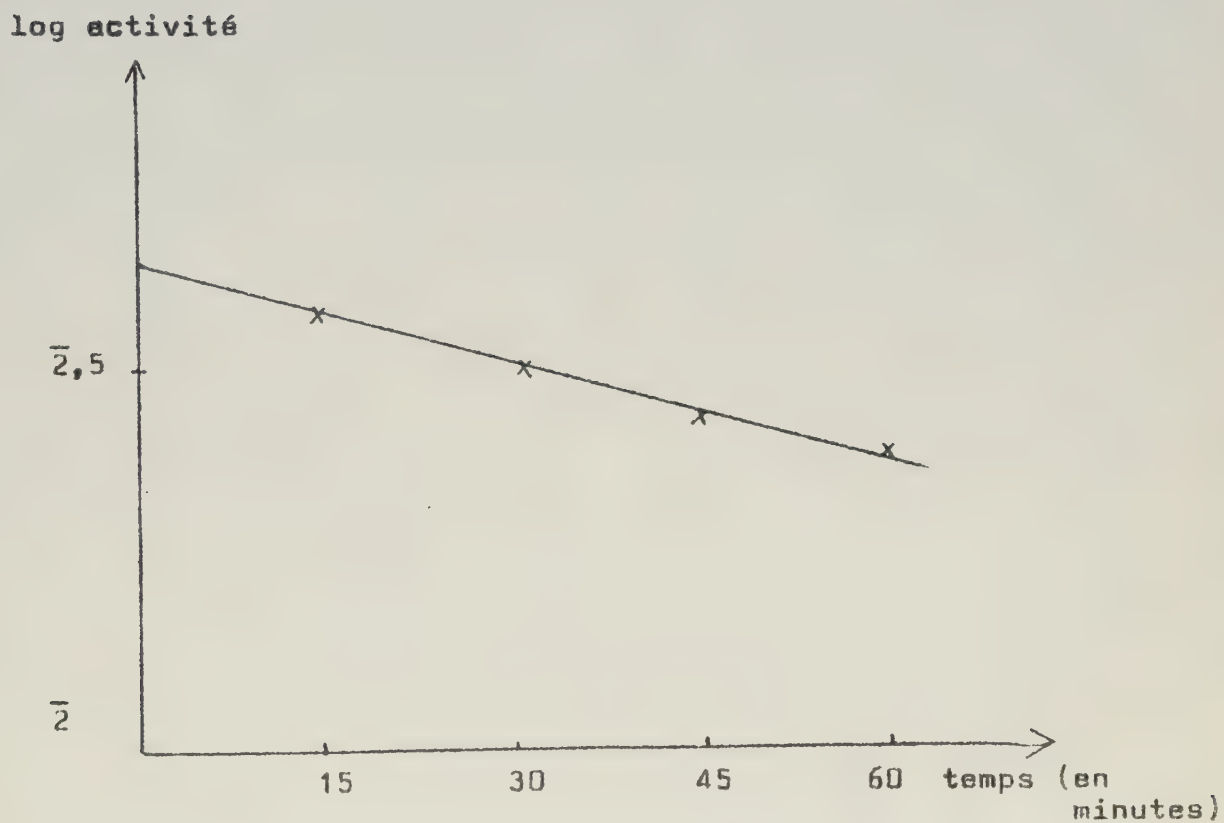


Figure n° 11

Inactivation de l' α mannosidase de Fenugrec à 45°,
en fonction du temps de chauffage.

substrat : p.nitrophényl α -D-mannoside

observe une inactivation notable.

6) Essais de différentes substances inhibitrices.

Une gamme assez étendue d'inhibiteurs a été essayée : Ag^+ , Hg^{++} , mannose, mannitol, iodoacétate... Les tentatives d'inhibition sur l'hydrolyse du phényl α -D-mannoside ont été abandonnées; en effet si on dose le phénol libéré par son absorption à 280 nm, en milieu alcalin, certains hydroxydes métalliques précipitent et gênent considérablement les lectures photométriques; le dosage par cuprimétrie du mannose libéré est évidemment perturbé par les inhibiteurs réducteurs, mais de plus la coloration est fortement inhibée par certains sels tels que le chlorure mercurique. Nous utilisons comme substrat le p.nitrophényl α -D-mannoside et nous ajoutons arbitrairement l'inhibiteur à un taux de 2 mM/litre. L'hydrolyse dure 30 mn. Nous nous assurons par un témoin que la coloration du p. nitro-phénol en milieu alcalin n'est perturbée par aucun de ces inhibiteurs.

Nous obtenons les résultats suivants :

<u>Inhibiteurs</u>	<u>% d'inhibition</u>
Ag NO_3	87
Hg Cl_2	20
Hg $(\text{CN})_2$	0
Zn Cl_2	0
Na Cl.....	0
Na F.....	0

cystéine.....	0
iodoacétate de sodium.....	0
mannose.....	0
mannitol.....	0
érythritol.....	0

III - D I S C U S S I O N

Les résultats obtenus avec l' α mannosidase de Fenugrec ne peuvent être comparés avec ceux de nombreuses autres α mannosidases. En effet, ainsi que le signale LI(60) les α mannosidases, contrairement aux autres osidases, ont été peu étudiées.

La purification de l' α mannosidase de Fenugrec a été relativement simple par rapport à la purification de l' α mannosidase du foie de Charonia lampas (67) (chromatographie sur DEAE cellulose et Sephadex G 200) ou celle de Fève Jack décrite par LI (précipitation par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, chromatographie sur colonne de Biogel P 200, puis sur colonne de phosphate de calcium (59) ou par précipitation par le sulfate d'ammonium, traitement par le tampon pyridine-acétate, chromatographie sur colonne de Biogel P 200, puis sur colonne de DEAE Sephadex (60) Contrairement à notre α mannosidase qui est éluée en tête sur Sephadex G. 200, celle de Fève Jack, d'après LI, ne peut être séparée sur ce support sur lequel elle resterait fortement accrochée.

Les deux réactions immunochimiques d'OUCHTERLONY et d'immunoélectrophorèse, ainsi que l'électrophorèse en gel de

polyacrylamide sont en faveur d'un degré de purification très avancé de notre α mannosidase.

Le fait que l' α mannosidase de Fenugrec soit éluee des colonnes de Sephadex G 200, avant les autres osidases et que son volume d'élution (210 ml) soit proche du volume mort de la colonne (176 ml) indiquerait un poids moléculaire élevé. Il en serait de même de l' α mannosidase de Fève Jack qui est éluee, elle aussi, en tête sur colonne de Biogel P 200.

Le pH optimum 4,50 de l'enzyme de Fenugrec vis à vis du p.nitrophényl α -D-mannoside est très proche de celui donné par LI (60) pour l'enzyme de Fève Jack (4,6). Il est un peu plus bas que celui des α mannosidases animales : 5,4 et 5,8 pour le sérum sanguin humain (87), 5,0 pour l'enzyme de l'épididyme de rat (14). L' α mannosidase de Streptomyces griseus a un pH optimum de 8,0 avec le phényl α -D-mannoside comme substrat.

L'affinité de l' α mannosidase de Fenugrec pour le phényl α -D-mannoside et le p.nitrophényl α -D-mannoside est relativement faible. Pour le p.nitrophényl α -D-mannoside, elle est identique à celle de Fève Jack (60). Le K_m est 2,5 mM. Avec l' α mannosidase d'épididyme de rat, le K_m est 13 mM. Comme nous l'avons fait remarquer précédemment, nous n'avons pu employer une concentration en substrat correspondant au palier de la vitesse, à cause de la solubilité limitée du p.nitrophényl α -D-mannoside. Il en fut de même pour l' α mannosidase d'épididyme de rat, pour laquelle CONCHIE s'est heurté à la même difficulté.

Au cours de l'étude de la cinétique, nous avons observé que l'activité α mannosidasique est proportionnelle au temps pendant 7 heures. Pour l' α mannosidase d'épididyme de rat, la durée de proportionnalité est 1 heure et pour l' α mannosidase de Fève Jack, seulement 15 minutes.

Les ions Ag^+ et Hg^{++} sont inhibiteurs de l' α mannosidase de Fenugrec. L'ion Ag^+ exerce même une action inhibitrice puissante (87%). Ces résultats sont analogues à ceux de CONCHIE pour l' α mannosidase d'épididyme de rat et à ceux de LI pour l' α mannosidase de Fève Jack. Le monoïodoacétate ne manifeste aucune action inhibitrice. Ces résultats sont analogues à ceux de MYRBÄCK (68) observés avec l'invertase. Peut-être peut-on penser à une combinaison de Ag^+ avec un reste histidine de l'enzyme, mais une interaction de ce métal avec un groupement SH n'est pas exclue : il est en effet possible que suivant la configuration de la protéine enzymatique, certains groupes SH soient inaccessibles à l'iodoacétate mais puissent être atteints par les ions métalliques.

LI signale que l' α mannosidase de Fève Jack est instable à la lyophilisation, au gel-dégel; nous avons observé cette instabilité au gel-dégel et à la lyophilisation à son pH optimum (4,3), par contre à pH 5,3 la lyophilisation a lieu avec une perte d'activité minime.

L' α mannosidase purifiée de Fenugrec semble relativement sensible à la chaleur; HELFERICH (46) au contraire avait observé une grande résistance au chauffage de l' α mannosidase de l'émulsine d'amande, ceci n'est sans doute observable

que dans une préparation riche en protéines comme le sont les "émulsines".

Enfin, il serait intéressant pour faire une comparaison plus étroite entre les α mannosidases de Fève Jack et de Fenugrec, d'étudier l'action de cette dernière, sur des substrats tels que les α 1 $\rightarrow$ 6, 1 $\rightarrow$ 2, 1 $\rightarrow$ 3 oligomannosides, plusieurs glycoprotéines (ovomucoïde, orosomucoïde, ovalbumine), utilisés par LI.

Il serait aussi intéressant de rechercher si l' α mannosidase de Fenugrec présente des propriétés transférantes, comme celle de Fève Jack.

D I S C U S S I O N G E N E R A L E D E S

R E S U L T A T S

-o-o-o-

Une partie discussion se trouvant dans les chapitres "Mode d'action de la β mannanase" et "Etude de l' α mannosidase", nous ne reprendrons pas celle-ci en détail.

En ce qui concerne la β mannanase de Fenugrec, nous mentionnerons qu'elle présente un mode d'action semblable aux β mannanases étudiées dans les champignons par REESE et SHIBATA (77). On ne peut la comparer à de nombreuses autres β mannanases, ces enzymes ayant fait jusqu'ici l'objet d'un nombre restreint de recherches. Il est cependant intéressant d'obtenir des résultats voisins chez cette β mannanase de végétaux supérieurs et chez les β mannanases fongiques étudiées par REESE.

La β mannanase de Fenugrec possède un mode d'action comparable à celui de nombreuses autres polysaccharidases : comme les cellulases, elle n'hydrolyse pas le disaccharide; comme la glucane hydrolase d'Aspergillus niger étudiée par CLARKE et STONE (11), l'oligosaccharide à DP le plus faible hydrolysé est le tétraose, alors que le tétraïtol n'est attaqué que d'une manière insignifiante. Il semble donc que quatre cycles mannopyranose soient indispensables, car le mannitol qui ne peut prendre la forme cyclique semble incapable de remplacer

une unité mannose du substrat.

D'autre part, le comportement de cette β mannanase peut être comparé à celui du lysozyme.

Quant à l' α mannosidase de Fenugrec, une discussion détaillée a été faite sur les propriétés qu'elle présente; nous rappellerons uniquement qu'elle possède de nombreux caractères comparables à l' α mannosidase de Fève Jack étudiée par LI (59).

Au point de vue métabolisme et utilisation dans la plante, le rôle de la β mannanase dans l'hydrolyse de la galactomannane de Fenugrec, au moment de la germination, paraît évident, en revanche celui de l' α mannosidase est moins clair. En effet, les α mannosides naturels sont très rares et aucun n'a été, à notre connaissance, signalé dans le Fenugrec.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

-o-o-o-

Dans l'extrait enzymatique obtenu à partir des graines germées de Fenugrec (Trigonella foenum graecum L. Légumineuses), nous avons mis en évidence, à côté d'autres osidases, l' α mannosidase et la β mannanase, sur lesquelles ont porté nos travaux.

L'extraction de la préparation enzymatique de Fenugrec est décrite.

Nous nous sommes tout d'abord attachée à la β mannanase. Son étude nécessitait la préparation de divers β oligomannosides et β oligomannosides réduits.

Un chapitre spécial de notre travail est réservé à la préparation, à la séparation des oligomannosides et oligomannosides réduits, et à l'étude analytique de ces derniers par rapport aux oligomannosides.

Les β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides ont été préparés par hydrolyse par de l'acide oxalique N de la poudre de corozo, et séparés sur colonne de Sephadex G 25, suivie de chromatographie sur papier. Le β mannobiose et le β mannotriose sont obtenus cristallisés.

Les β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides réduits ont été préparés par réduction par le borohydrure de potassium, de l'hydrolysate oxalique de la poudre de corozo. Ils ont ensuite été purifiés

sur colonne de charbon-célite.

Le β mannotriitol a été obtenu cristallisé.

L'étude analytique des oligomannosides réduits a été effectuée.

- Le β mannotriitol présente un PF = 206° non corrigé, il cristallise avec 1 molécule d'eau.

- Au cours de la chromatographie sur papier S.S. bMgl 2043, en solvant butanol-pyridine-eau 9/5/4 le R mannitol

du β mannobiitol est 0,59

β mannotriitol " 0,25

β mannotétraïtol " 0,06

- Ces oligomannosides réduits présentent la bande caractéristique des liaisons β mannopyranosyl située à 885 cm^{-1}

- L'étude de l'oxydation periodique des oligomannosides réduits, a été faite comparativement aux oligomannosides. Les résultats de l'oxydation appellent les observations suivantes :

* les courbes correspondant à l'acide periodique consommé, et à l'acidité apparue sont assez semblables pour les oligomannosides et les oligomannosides homologues réduits.

* quant à l'aldéhyde formique, il y a évidemment libération d'une molécule d'aldéhyde par molécule d'oligomannoside tandis qu'il y en a deux par molécule d'oligomannoside réduit.

* On observe un ralentissement de l'oxydation periodique, lorsque le nombre de restes mannopyranosyl augmente. LE DIZET l'a déjà signalé pour les oligomannosides. Nous le

retrouvons d'une manière encore plus accentuée pour les oligomannosides réduits.

Divers essais de purification de la β mannanase, chromatographie sur Sephadex G 200, précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium, électrophorèse en débit continu, n'ont pas été très fructueux.

Quelques propriétés de la β mannanase (pH optimum = 5,3, influence de la concentration en substrat), sont données, bien que l'insolubilité de son substrat, la mannane, gêne ces déterminations.

Devant la difficulté de la purification de la β mannanase, nous avons étudié la spécificité d'action de celle-ci sur des substrats contenant exclusivement des groupes mannopyranosyl, ce qui nous permet d'utiliser la préparation enzymatique totale, puisque celle-ci ne contient pas de β mannosidase.

Dans cette catégorie de substrats contenant exclusivement des groupes mannopyranosyl, nous avons choisi les β (1 $\rightarrow$ 4) mannanes de corozo et de Phoenix canariensis, les β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides (β mannobiose, β mannotriose, β mannotétraose, β mannopentaose) et les β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides réduits (β mannobiitol, β mannotriitol, β mannotétraïtol et β mannopentaïtol).

Le β mannobiose et le β mannotriose ne sont pas attaqués.

Le β mannotétraose et le β mannopentaose sont

hydrolysés en mannobiose, mannotriose avec apparition de traces de mannose. S'il y avait une simple hydrolyse du β mannotétraose, il devrait y avoir la même quantité de mannose et de mannotriose libérés; ce n'est pas le cas. Peut-être peut-on envisager une hypothèse de transfert, puis d'hydrolyse.

Les oligomannosides réduits sont attaqués plus difficilement puisque le β mannobiitol, le β mannotriitol et le β mannotétraitol ne sont pas hydrolysés. La β mannanase n'hydrolyse cette série qu'à partir du β mannopentaitol qui est scindé en β mannobiose, β mannotriose, β mannobiitol et β mannotriitol.

L'hydrolyse des mannanes de corozo ou de Phoenix canariensis conduit à une série d'oligomannosides : mannotétraose, mannotriose, mannobiose, avec seulement des traces de mannose.

Ces résultats suggèrent que la β mannanase ne peut hydrolyser que des substrats comportant au moins quatre cycles mannopyranose. Dans les oligomannosides réduits, le mannitol terminal, qui ne peut prendre la forme cyclique, semble incapable de remplacer une unité mannose. Pour cette raison l'oligomannoside à DP le plus faible hydrolysé est le β mannotétraose et l'oligomannoside réduit est le β mannopentaitol.

L'absence d'hydrolyse du β mannobiose, ainsi que le fait qu'à partir des mannanes comme à partir des oligomannosides seulement des traces de mannose sont libérées, permettent de penser que la β mannanase est une endopolysaccharidase.

Une autre partie de notre travail a été consacrée à

la purification et à l'étude de l' α mannosidase de Fenu grec.

La purification a été réalisée par précipitation de l'enzyme brut par le sulfate d'ammonium, puis par chromatographie sur colonne de Sephadex G 200, d'où l' α mannosidase est éluée en tête, avant les autres protéines. L'enzyme est conservé lyophilisé.

L' α mannosidase purifiée est exempte des osidases présentes dans l'enzyme brut. Nous avons vérifié sa pureté :

- 1) par deux techniques immunologiques (test d'OUCHTERLONY et immunoélectrophorèse) : l' α mannosidase éluée ne donne qu'un seul arc de précipitation avec l'immunsérum obtenu par inoculations répétées au Lapin de l'extrait enzymatique total.
- 2) par électrophorèse en gel de polyacrylamide : nous avons observé à côté de la bande principale une impureté protéique à l'état de trace.

Nous avons étudié différentes propriétés de l' α mannosidase. Pour cela, nous employons comme substrat le p. nitrophényl α -D-mannoside.

L'hydrolyse optimale est observée avec un tampon de pH 4,30, le pH optimum du milieu réactionnel étant alors 4,50.

Nous avons déterminé son K_m à pH 4,50 ($K_m = 2,5$ mM). La solubilité du substrat ne nous a pas permis de dépasser une concentration de 18,7 mM dans le milieu réactionnel. D'après la courbe $v = f(s)$, cette concentration ne correspond pas au palier de la vitesse. Cependant elle représente 7,5 fois le K_m de l'enzyme et n'est pas très éloignée de la concentration saturante pour cet enzyme. C'est cette concentration qui fut

adoptée pour tous les autres essais.

L'étude cinétique montre que l'activité α mannosidase est proportionnelle au temps au moins pendant 7 heures. Le palier ne correspond pas à l'utilisation de la totalité du substrat. Si on ajoute alors de l'enzyme, l'hydrolyse reprend. L'arrêt de la réaction proviendrait donc de la dénaturation de l'enzyme et non d'une inhibition par les produits libérés au cours de l'hydrolyse.

La courbe log activité en fonction du temps d'inactivation, à une température donnée, est une droite. Ceci tendrait à prouver qu'une seule espèce enzymatique participe à l'hydrolyse du substrat.

Parmi toute une série d'inhibiteurs essayés, seuls AgNO_3 et HgCl_2 ont provoqué une inhibition notable.

L' α mannosidase de Fenugrec présente de nombreux caractères comparables à l' α mannosidase de Fève Jack : même pH optimum, même K_m , mêmes inhibiteurs (Ag^+ et Hg^{++}), instabilité au gel-dégel.

B I B L I O G R A P H I E

-O-O-O-

1. ALM (R.S.), WILLIAMS (R.J.P.) et TISELIUS (A.)
Acta Chem. Scand., 1952, 6, 826.
2. ANDREWS (P.), HOUGH (L.) et JONES (J.K.N.)
J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 4029.
3. ARNAUD (M.)
Th. Doct. Etat. Pharm., Paris, 1958.
4. BAILEY (R.W.)
J. Chromatog., 1962, 8, 57.
5. BAILEY (R.W.) et BOURNE (E.J.)
J. Chromatog., 1960, 4, 206.
6. BOURQUELOT (E.) et HERISSEY (H.)
J. Pharm. Chim., 1899, 10, 438.
7. BOURQUELOT (E.) et HERISSEY (H.)
J. Pharm. Chim., 1900, 11, 104.
8. BOURQUELOT (E.) et HERISSEY (H.)
J. Pharm. Chim., 1900, 11, 357.
9. BOURQUELOT (E.) et HERISSEY (H.)
J. Pharm. Chim., 1920, 21, 81.
10. BUCHANAN (J.G.), DEKKER (C.A.) et LONG (A.G.)
J. Chem. Soc., 1950, 3163.
11. CLARKE (A.E.) et STONE (B.A.)
Biochem. J., 1965, 96, 802.

12. CONCHIE (J.), FINDLAY (J.) et LEVVY (G.A.)
Biochem. J., 1959, 71, 318.
13. CONCHIE (J.), FINDLAY (J.) et LEVVY (G.A.)
Nature, 1956, 178, 1469.
14. CONCHIE (J.) et HAY (A.J.)
Biochem. J., 1959, 73, 327.
15. CONCHIE (J.) et LEVVY (G.A.)
Biochem. J., 1957, 65, 389.
16. CONCHIE (J.) et LEVVY (G.A.)
Biochem. J., 1962, 84, 7 P.
17. CONCHIE (J.) et MANN (T.)
Nature, 1957, 179, 1190.
18. COURTOIS (J.E.)
Arquivos Portugueses de Bioquimica 1962, 5, 356.
19. COURTOIS (J.E.), CARRERE (C.) et PETEK (F.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 1251.
20. COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.) et DEBRIS (M.M.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 1961, 252, 2608.
21. COURTOIS (J.E.) et LE DIZET (P.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 743.
22. COURTOIS (J.E.) et LE DIZET (P.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 535.
23. COURTOIS (J.E.) et PERCHERON (F.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 167.
24. COURTOIS (J.E.) et PERCHERON (F.)
J. Pharm. Belg., 1963, 18, 23.

25. COURTOIS (J.E.) et PERLES (R.)
dans "Traité de Biochimie Générale", BOULANGER
(P.) et POLONOVSKI (J.), Masson Ed., Paris 1964.
26. COURTOIS (J.E.), PETEK (F.) et KADA (T.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 2031.
27. COURTOIS (J.E.), PETEK (F.) et TO DONG
Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 11.
28. COURTOIS (J.E.) et RAMET (M.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1947, 29, 240.
29. DALOUL (M.)
Th. Doct. Etat Pharm. Paris, 1963.
30. DAVIS (B.J.) et ORNSTEIN (L.)
"A New High Resolution Electrophoresis Method"
delivered at the Society for the Study of Blood,
March 24, 1959, at the New York Academy of
Medicine.
31. DAVY (J.)
Th. Doct. Univ. Pharm. Paris, 1966.
32. DEDONDER (R.)
dans "Chromatographie en chimie organique et
biologique", LEDERER, Masson Ed., Paris 1960.
33. DIMROTH (O.) et SCHWEITZER (R.)
Ber., 1923, 56, 1375.
34. DREYWOOD (R.)
Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.), 1946, 18, 499.
35. DUNCAN (W.A.M.), MANNERS (D.J.) et ROSS (A.G.)
Biochem. J., 1956, 63, 44.

36. EEGRIVE (E.)
Z. Anal. Chemie, 1937, 110, 22.
37. FLEURY (P.)
Bull. Soc. Chim. France, 1955, 1126.
38. FLEURY (P.) et LANGE (J.)
J. Pharm. Chim., 1933, 17, 107.
39. FLODIN (P.)
J. Chromatog., 1961, 5, 103.
40. FLODIN (P.) et ASPBERG (K.)
Biological Structure and Function. Vol. I,
Academic Press Inc., London and New York
41. FRENCH (D.) et WILD (G.M.)
J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 2612.
42. GOLDBERG (R.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 1967, 264, 1036.
43. GRABAR (P.) et WILLIAMS (C.A.Jr)
Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, 193.
44. GUERNET (M.)
Th. Doct. Etat Sciences, Paris, 1963.
45. GUILLOUX (E.) et DEUGIRAUD (S.)
Bull. Soc. Chim. France, 1965, 259.
46. HELFERICH (B.)
Ergeb. Enzymforsch., 1938, 7, 97.
47. HELFERICH (B.) et SCHMITZ-HILLEBRECHT
Ber. Dtsch Chem. Gesell., 1933, 66, 378.
48. HELFERICH (B.) et VORSATZ (E.)
Z. physiol. Chem., 1935, 237, 254.

49. HELFERICH (B.) et WINKLER (S.)
Ber. Dt̃sch. Chem. Gesell., 1933, 66, 1556.
50. HERISSEY (H.)
J. Pharm. Chim., 1921, 23, 409.
51. HOCKENHULL (D.J.D.), ASHTON (G.C.), FANTES (K.H.) et
WHITEHEAD (B.K.)
Biochem. J., 1954, 57, 93.
52. HUDSON (C.S.) et DALE (J.K.)
J. Amer. Chem. Soc., 1915, 37, 1280.
53. HYLIN (J.W.) et SAWAI (Ko)
J. Biol. Chem. 1964, 239, 990.
54. JERMYN (M.A.)
Austral. J. Chem. 1955, 8, 403.
55. JONES (J.K.N.) et NICHOLSON (W.H.)
J. Chem. Soc., 1958, 27.
56. LE DIZET (P.)
Th. Ing. Doct. Paris, 1963.
57. LEVVY (G.A.), HAY (A.J.) et CONCHIE (J.)
Biochem. J., 1963, 89, 102 P.
58. LEVVY (G.A.), HAY (A.J.) et CONCHIE (J.)
Biochem. J., 1964, 91, 378.
59. LI (Y.T.)
J. Biol. Chem., 1966, 241, 1010.
60. LI (Y.T.)
J. Biol. Chem. 1967, 242, 5474.
61. LI (Y.T.) et SHETLAR (M.R.)
Comp. Biochem. Physiol., 1965, 14, 275.

62. LINEWEAVER (H.) et BURK (D.)
J. Amer. Chem. Soc., 1934, 56, 658.
63. LOISELEUR (J.)
Tome II, p. 26, Masson Ed., 1954.
64. LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.) et RANDALL (R.)
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
65. LYR (H.)
Z. Allgem. Mikrobiol., 1963, 3, 25.
66. LYR (H.) et NOVAK (E.)
Z. Allgem. Mikrobiol., 1961, 2, 86.
67. MURAMATSU (T.)
Arch. Biochem. Biophys., 1966, 115, 427.
68. MYRBÄCK (K.)
The Enzymes - BOYER (P.D.), LARDY (H.) et
MYRBÄCK (K.), Academic Press New York, Ed.,
1960, Vol. 4, 389.
69. NAGAOKA (T.)
Tohoku J. Exptl. Med., 1949, 51, 131.
70. NELSON (N.)
J. Biol. Chem., 1944, 153, 375.
71. NOVELLIE (L.)
Nature, 1950, 166, 745.
72. OTERO ABALO (R.) et REGUEIRO VARELA (B.)
Microbiol. Espan, 1960, 13, 15.
73. DUCHTERLONY (Ö.)
Acta Path. Microbiol. Scand., 1948, 25, 186.
74. PARNAS (J.K.) et WAGNER (R.)
Biochem. Z., 1921, 125, 253.

75. PERCHERON (F.)

in "Chromatography" - E. HEFTMANN Ed. 2^o
édition, Reinhold publishing Corporation,
New York, 1967.

76. PETEK (F.)

Th. Doct. Univ. Pharm. Paris, 1962.

77. REESE (E.T.) et SHIBATA (Y.)

Canad. J. of Microbiol., 1965, 11, 167.

78. SATOSHI INNAMI

Ag. Biol. Chem. 1961, 25, 155.

79. SOMOGYI (M.)

J. Biol. Chem., 1945, 160, 61.

80. SPIK (G.) et MONTREUIL (J.)

Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 739.

81. STAHL (E.)

Dunnschicht-Chromatographie, Springer Ed., Berlin 196

82. STAHL (E.) et KALTENBACH (U.)

J. Chromatog., 1961, 5, 351.

83. TAYLOR (B.M.) et WHELAN (W.J.)

Chem. and Ind., 1962, 44.

84. TREVELYAN (W.E.), PROCTER (D.P.) et HARRISON (J.S.)

Nature, 1950, 166, 444.

85. TRONCHET (J.M.J.)

Bull. Soc. Hist. nat. Doubs, 1961, 63, 49.

86. TRONCHET (J.M.J.)

Annales scientif. Université de Besançon
1962, 2^o Série, Zoologie, 17, 157.

87. TRONCHET (J.M.J.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 1963, 256, 1395.
88. UTSUSHI (M.), HUJI (K.), MATSUMOTO (S.) et NAGAOKA (T.)
Tohoku J. Exptl. Med., 1949, 50, 175.
89. WESTPHAL (O.) et FEIER (H.)
Chem. Ber. 1956, 89, 582.
90. WHISTLER (R.L.) et DURSO (D.F.)
J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72, 677.
91. WHISTLER (R.L.) et SMITH (C.G.)
J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 3795.

T A B L E D E S M A T I E R E S

-0-0-0-

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION.....	1
GENERALITES.....	5
PREMIERE PARTIE : MATERIEL ET METHODES.....	13
I. TECHNIQUES GENERALES.....	15
A) TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES.....	15
1) Chromatographie d'adsorption.....	15
2) Chromatographie d'exclusion sur Sephadex....	15
3) Chromatographie sur papier.....	16
a) Choix du papier.....	16
b) Mélanges solvants.....	17
c) Technique.....	17
d) Révélateurs.....	17
α) Oses et osides réducteurs.....	18
β) Oses et osides réducteurs ou non	
réducteurs.....	18
γ) Oligosaccharides à liaison (1→4).....	19
4) Chromatographie sur couches minces.....	20
a) Support.....	21
b) Solvant.....	21
c) Migration.....	21
d) Révélateurs.....	22

B) OXYDATION PERIODIQUE.....	22
1) Détermination de l'acide periodique consommé	24
2) Détermination de l'acidité apparue.....	24
3) Détermination de l'aldéhyde formique.....	27
C) DOSAGE DES GLUCIDES.....	27
1) Réaction à l'anthrone.....	27
2) Technique de NELSON-SOMOGYI.....	28
D) DOSAGE DES PHENOLS.....	29
1) Dosage du phénol.....	29
2) Dosage du nitrophénol.....	29
E) DOSAGE DES PROTEINES.....	30
1) Absorptiométrie à 280 nm.....	30
2) Réfractométrie.....	30
3) Méthode au biuret.....	30
4) Méthode de LOWRY.....	30
5) Méthode de KJELDAHL.....	31
II. PREPARATION DE SUBSTRATS CLASSIQUES POUR L'ETUDE DE DIVERSES OSIDASES.....	33
A) SUBSTRATS NECESSAIRES POUR L'ETUDE DE LA β MANNANASE.....	33
1) β (1 $\rightarrow$ 4) mannane de <u>Phoenix canariensis</u>	33
2) β (1 $\rightarrow$ 4) mannane de Corozo.....	34
3) Phényl β -D mannoside.....	34
4) β (1 $\rightarrow$ 4) oligomannosides et β (1 $\rightarrow$ 4) oligoman- nosides réduits.....	36

B) SUBSTRATS NECESSAIRES POUR L'ETUDE DE L' α	
MANNOSIDASE.....	36
1) Phényl α -D mannoside.....	36
2) Nitrophényl α -D mannoside.....	36
C) SUBSTRATS POUR L'IDENTIFICATION DES AUTRES	
OSIDASES ACCOMPAGNANT LA β MANNANASE ET L' α	
MANNOSIDASE DANS L'EXTRAIT ENZYMATIQUE DE	
FENUGREC.....	38
DEUXIEME PARTIE : PREPARATION ET SEPARATION DE QUELQUES	
OLIGOMANNOSIDES. PREPARATION, SEPARATION ET ETUDE DE	
QUELQUES OLIGOMANNOSIDES REDUITS.....	39
I. PREPARATION ET SEPARATION DES β (1 $\rightarrow$ 4) OLIGOMANNO-	
SIDES.....	41
A) - PREPARATION.....	42
B) - ISOLEMENT.....	44
1) Principe.....	44
2) Technique.....	44
C) - CARACTERES.....	45
II. PREPARATION, SEPARATION ET ETUDE DES OLIGOMANNO-	
SIDES REDUITS.....	45
A) PREPARATION.....	45
B) SEPARATION.....	47
1) Principe.....	47
2) Technique.....	48
a) L'adsorbant.....	48
b) Caractéristiques et conditionnement de la	
colonne.....	48

c) Liquides d'élution.....	49
d) Choix du gradient.....	50
e) Localisation des différents pics.....	50
f) Récupération des oligomannosides dans les éluats.....	53
g) Obtention des oligomannosides réduits purs.....	53
C) ETUDE ANALYTIQUE.....	54
1) Caractères physiques.....	54
2) Migration chromatographique.....	55
3) Détermination des résidus mannopyranosyl par la réaction à l'anthrone.....	55
4) Etude de l'oxydation periodique.....	56
- Acide periodique consommé.....	56
- Acidité apparue.....	59
- Aldéhyde formique libéré.....	59
TROISIEME PARTIE : ETUDE DE LA β MANNANASE DES GRAINES GERMEES DE FENUGREC. SON MODE D'ACTION.....	67
I. EXTRACTION DE LA PREPARATION ENZYMATIQUE DE FENUGREC.....	70
II. ESSAIS DE PURIFICATION DE LA β MANNANASE.....	71
1) Par chromatographie sur colonne de Sephadex G 200.....	71
2) Par précipitations fractionnées par le sulfate d'ammonium.....	71
3) Par électrophorèse en débit continu.....	71

III. ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DE LA β MANNANASE..	72
1) pH optimum.....	72
2) Courbe de l'activité par rapport à la concen- tration en substrat.....	72
IV. MODE D'ACTION DE LA β MANNANASE.....	72
1) Principe.....	72
2) Techniques expérimentales et résultats.....	73
3) Discussion.....	75
QUATRIEME PARTIE. ETUDE DE L' α MANNOSIDASE DE FENUGREC..	83
I. PURIFICATION DE L' α MANNOSIDASE PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION.....	85
1) Technique.....	85
a) Conditionnement de la colonne.....	85
b) Détermination de l'activité enzymatique des différentes fractions.....	86
c) Récolte de l' α mannosidase.....	87
2) Résultats et remarques sur la séparation sur Sephadex G 20S.....	88
3) Vérification de la pureté de l' α mannosidase...	92
a) Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	93
b) Etude immunologique.....	94
α) Technique d'OUCHTERLONY.....	94
β) Immunoélectrophorèse.....	94
II. ETUDE DES PROPRIETES DE L' α MANNOSIDASE.....	95
1) Détermination de l'activité enzymatique.....	95
2) Détermination du pH optimum.....	95
3) Constante de MICHAELIS (K_m).....	99

4) Cinétique de la réaction.....	99
5) Inactivation par la chaleur.....	100
6) Essais de différentes substances inhibitrices..	105
III. DISCUSSION.....	106
DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS.....	111
CONCLUSIONS GENERALES.....	113
BIBLIOGRAPHIE.....	119
TABLE DES MATIERES.....	127
